

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Zürich  
Direktor: Prof. Dr. F. Leuthardt

---

# Die biologische Citrullinsynthese

---

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT ZÜRICH

VORGELEGT VON

**Alex F. Müller**  
von Ossingen (Zürich)

Genehmigt auf Antrag von Herrn Prof. Dr. Leuthardt



ZÜRICH 1949  
Dissertationsdruckerei Leemann AG.



Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Zürich  
Direktor: Prof. Dr. F. Leuthardt

---

# Die biologische Citrullinsynthese

---

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT ZÜRICH

VORGELEGT VON

**Alex F. Müller**

von Ossingen (Zürich)

Genehmigt auf Antrag von Herrn Prof. Dr. Leuthardt



ZÜRICH 1949

Dissertationsdruckerei Leemann AG.



MEINEN ELTERN



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41507215\\_0116](https://archive.org/details/IA41507215_0116)

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                           | Seite |
|---------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>I. Teil: Chemische Reaktionsmechanismen</b>                            |       |
| 1. Harnstoffbildung . . . . .                                             | 7     |
| a) Krebs'sche Formulierung . . . . .                                      | 7     |
| b) Beweise und Einwände . . . . .                                         | 8     |
| c) Einzelreaktionen . . . . .                                             | 10    |
| 2. Rolle der Glutaminsäure und des Glutamins . . . . .                    | 11    |
| 3. Citrullinbildung aus Ornithin . . . . .                                | 13    |
| a) CO <sub>2</sub> -Fixation . . . . .                                    | 13    |
| b) Herkunft des Ammoniaks . . . . .                                       | 14    |
| <b>II. Teil: Fermente und ihre Lokalisation</b>                           |       |
| 1. Schnitte und Gewebsbrei . . . . .                                      | 15    |
| 2. Mitochondrien . . . . .                                                | 16    |
| a) Historischer Überblick . . . . .                                       | 16    |
| b) Morphologie, Vorkommen, chemische Zusammensetzung . . . . .            | 17    |
| c) Darstellung von Mitochondriensuspensionen . . . . .                    | 19    |
| <b>III. Teil: Versuche</b>                                                |       |
| 1. Problemstellung . . . . .                                              | 21    |
| 2. Experimenteller Teil . . . . .                                         | 25    |
| 3. Ergebnisse . . . . .                                                   | 30    |
| a) Vergleich von Glutaminsäure und Glutamin . . . . .                     | 30    |
| b) Vergleich zwischen Mitochondrien und ausgewaschenem Präparat . . . . . | 34    |
| c) Abhängigkeit von Adenosintriphosphat . . . . .                         | 36    |
| d) Einfluß von Dicarbonsäuren und Ketosäuren . . . . .                    | 36    |
| e) Einfluß der NH <sub>3</sub> -Konzentration . . . . .                   | 37    |
| f) Hemmung durch Malonat . . . . .                                        | 37    |
| g) $\alpha$ -Ureidoglutarsäure und Citrullinsynthese . . . . .            | 38    |
| h) Hemmung durch Janusgrün . . . . .                                      | 40    |
| 4. Diskussion . . . . .                                                   | 43    |
| Zusammenfassung . . . . .                                                 | 47    |
| Literatur . . . . .                                                       | 48    |



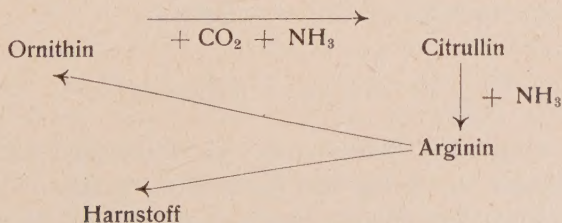
## I. TEIL

### Chemische Reaktionsmechanismen

#### 1. Harnstoffbildung

##### a) *Krebs'sche Formulierung*

Seit der Entdeckung des Harnstoffes haben die Physiologen und Chemiker versucht, seine biologische Synthese zu verwirklichen. Die moderne Theorie der Harnstoffbildung nimmt ihren Anfang mit der Entdeckung der Arginase durch *Kossel* und *Dakin* [1]\*), welche in der Leber der Säugetiere ein Ferment feststellten, das Arginin in Harnstoff und Ornithin zu spalten vermag. Arginase kommt nur bei denjenigen Tieren in der Leber vor, die befähigt sind, Harnstoff zu bilden, d. h. bei allen jenen Tieren, die ihren Stickstoff in Form des Harnstoffs ausscheiden, im Gegensatz zu den Sauropsiden, die anstelle des Harnstoffs Harnsäure bilden. Diese Tatsache ließ einen Zusammenhang zwischen Arginin und Harnstoffsynthese vermuten. Es ist das Verdienst von *H. A. Krebs* und *K. Henseleit* [2], den Verlauf der Synthese, den Harnstoff oder Ornithincyclus aufgestellt zu haben. Der *Krebs*scyclus verläuft folgendermaßen:



Ein einziges Ornithinmolekül kann somit unbegrenzt viele Harnstoffmoleküle liefern (katalytische Wirkung).

\*) Ziffern in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis.

*Krebs* und *Henseleit* verwenden in ihren Versuchen dünne (0,3—0,4 mm) Gewebsschnitte (nach *Warburg*) aus der Leber der Ratte oder des Meerschweinchens. Wichtig ist dabei, die Gewebstruktur soweit als möglich zu erhalten und das Gewebe ausreichend mit Nährstoffen, besonders Sauerstoff, zu versorgen, was durch genügendes Schütteln der Schnitte in der Versuchsflüssigkeit erreicht wird. Als Versuchsflüssigkeit wurde eine physiologische Salzlösung, die dem Säugetierserum in bezug auf die anorganischen Salze nahe kommt, verwendet. Wenn man Gewebsschnitte mit einer solchen Versuchslösung, die Ornithin, Ammoniak, Hydrogencarbonat und ein Atemsubstrat, wie Glucose oder Pyruvat, enthält, bei 38° schüttelt, so entsteht Harnstoff. Zusatz von Ornithin läßt die Harnstoffbildung in der Rattenleber stark ansteigen. *Krebs* weist darauf hin, daß mit einem Gewebsbrei, in dem die Zellstrukturen zerstört sind, kein Harnstoff gebildet werden kann.

Nun ist es aber in neuerer Zeit gelungen, mit dem nach *Potter* und *Elvehjem* [3] hergestellten Gewebsbrei, einem sogenannten Homogenat, in dem die Zellstrukturen ganz zerstört sind, Harnstoff zu bilden (*Cohen* und *Hayano* [4], *Borsook* und *Dubnoff* [5]). Der in einer blutisotonischen KCl-Lösung hergestellte Gewebsbrei muß außer durch Ornithin, Ammoniak und Hydrogencarbonat noch durch Magnesiumionen, Adenosintriphosphat, Glutaminsäure, Fumarat und einen Phosphatpuffer ergänzt werden. Auch hier läßt sich die von *Krebs* postulierte katalytische Wirkung des Ornithins nachweisen. (Für die Darstellung eines Homogenates wird auf den experimentellen Teil verwiesen.)

#### b) Beweise und Einwände

Die katalytische Wirkung des Ornithins und Citrullins, wie sie die Theorie von *Krebs* und *Henseleit* annimmt, wurde anhand von vielen Versuchen (*Gornall* und *Hunter* [6]) bewiesen. Auch die Herkunft des Harnstoffes aus der Guanidingruppe des Arginins wurde mittels des schweren Stickstoffs durch *Schoenheimer* und Mitarbeiter [7] sichergestellt.

Nach *Bach* [8] hingegen soll das Citrullin wohl an der Harn-

stoffsynthese teilnehmen, nicht aber als Katalysator; es soll aufgebraucht werden, indem es durch eine Ketosäure direkt zu Harnstoff und Glutaminsäure oxydiert wird. Diese Reaktion ist hypothetisch; in Anbetracht der Komplexität des Systems und der vielen Reaktionen, die dasselbe beeinflussen können, scheinen die Experimente von *Bach* nicht leicht zu interpretieren.

Es sind nun aber auch in jüngster Zeit noch Zweifel in bezug auf die Bedeutung des Citrullins als Zwischenprodukt der Harnstoffsynthese geäußert worden. *Borsook* und *Dubnoff* [5] beobachteten, daß 0,0026 Mol Na-Arsenat die Harnstoffbildung aus Citrullin in der Leber nicht beeinflußt, während dieselbe Arsenkonzentration die Argininbildung aus Citrullin in Nierenschnitten vollständig unterdrückt. Sie werfen deshalb die Frage auf, ob in der Leber das Citrullin den Harnstoff tatsächlich durch Überführung in Arginin bildet oder ob nicht ein anderer Weg möglich ist.

Eine weitere Beobachtung, die gegen eine Beteiligung des Citrullins an der Harnstoffbildung zu sprechen scheint, ist kürzlich von *Nadine* und *Buchanan* [9] mitgeteilt worden. Leberschnitte wurden in Gegenwart von markiertem Hydrogencarbonat ( $C^{13}$ ) und Ammoniumsalz mit und ohne Citrullinzusatz geschüttelt. In beiden Fällen wies der entstandene Harnstoff fast den gleichen  $C^{13}$ -Gehalt auf. Das Citrullin, das am Versuchsende wieder isoliert wurde, enthielt keinen schweren Kohlenstoff, hatte also während der Reaktion seinen Carbamidkohlenstoff nicht ausgetauscht. Dieses Resultat kann nicht ohne weiteres durch mangelnde Diffusion erklärt werden, denn das zugesetzte Citrullin steigert die Harnstoffsynthese in den Schnitten, und außerdem ist bekannt, daß im Schnitt gebildetes Citrullin leicht in das Milieu diffundiert (*Gornall* und *Hunter* [6]). Es bleibt abzuwarten, in welcher Weise diese Widersprüche ihre Aufklärung finden werden.

Nun haben aber in einer vor kurzem erschienenen Arbeit *Grisolia* und *Cohen* [10] den Nachweis geleistet, daß das Citrullin, welches im Leberhomogenat gebildet wird, gleichviel  $C^{11}$  enthält wie das zugesetzte Hydrogencarbonat und wie der nachträglich aus diesem Citrullin gebildete Harnstoff. Diese Versuche sprechen eindeutig für eine Beteiligung des Citrullins im Ornithincyclus im Sinne der *Krebs'schen* Theorie.

*Leuthardt* [11] konnte in Schnitten zeigen, daß das Glutamin, das den Pflanzenphysiologen schon lange als Stickstoff- und Kohlenstoffreserve und als Transportform von Stickstoff bekannt ist, in der Meerschweinchenleber fast ebensoviel Harnstoff liefert wie Ammoniumsalze. Ammoniak als ausgesprochenes Zellgift wird von der Leber sofort in Harnstoff umgewandelt. Der Harnstoff ist entgiftetes Ammoniak (*Löffler* [12]). Die Harnstoffsynthese aus Glutamin ist merkwürdigerweise vom Ornithinzusatz unabhängig, auch wenn im gleichen Gewebe die Harnstoffbildung aus Ammoniumsalzen stark gesteigert wird. Diese Unabhängigkeit vom Ornithin erklärt *Leuthardt* auf folgende Weise: Die Base Ornithin, das eigentliche Coferment der Synthese, wird aus seiner Bindung mit dem Apoferment durch das stark basische Ammoniak verdrängt, nicht aber durch das neutrale Glutamin. Da es sich um einen Kreisprozeß handelt, genügt die in den Schnitten vorhandene Menge Ornithin vollauf, und ein weiterer Zusatz ist nutzlos. Bei Gegenwart von Ammoniak muß dessen hemmende Wirkung durch vermehrten Ornithinzusatz aufgehoben werden. Wenn nun das Glutamin einfach hydrolysiert würde zu Glutaminsäure und Ammoniak, wäre diese Unabhängigkeit vom Ornithin nicht zu verstehen. Es kann weiter gezeigt werden, daß die Konzentration des durch Hydrolyse abgespaltenen Ammoniaks zu klein wäre (im Milieu und im Innern des Gewebes), um die tatsächlich beobachtete Geschwindigkeit der Reaktion zu erklären. Man kann die Glutaminbildung wie die Harnstoffbildung als Entgiftung des Ammoniak auffassen. Das Glutamin würde demnach ebenfalls eine Form von entgiftetem Ammoniak darstellen, aber im Gegensatz zum Harnstoff eine Form mit sehr reaktionsfähigem Stickstoff. Die Versuche *Leuthardts* zeigen, daß der Stickstoff des Glutamins in den Cyclus leicht einbezogen wird.

### c) Einzelreaktionen

Im Gegensatz zu der Schnittmethode gelang es im Leberhomogenat die beiden Teilstufen der Harnstoffsynthese, die Umwandlung des Ornithins in das Citrullin (*Cohen* und *Hayano* [13]) und des Citrullins in das Arginin (*Borsook* und *Dubnoff* [14],

*Cohen* und *Hayano* [15] voneinander abzutrennen und sie einzeln für sich zu untersuchen. Damit war nun auch die Möglichkeit geschaffen, die Vielseitigkeit und die verschiedenen Stadien der daran beteiligten Einzelreaktionen zu studieren.

In der Bildung des Arginins aus dem Citrullin handelt es sich um eine besondere Form der Transaminierung in dem Sinne, wie sie von *Braunstein* und *Kritzmann* [16] zuerst entdeckt wurde. Als unmittelbare Stickstoffquelle kommt die  $\alpha$ -Aminogruppe der Glutaminsäure oder Asparaginsäure in Frage. Die beiden Monoamino-dicarbonsäuren können durch die entsprechenden  $\alpha$ -Keto-dicarbonsäuren + Ammoniak ersetzt werden.

Bei der Citrullinbildung aus dem Ornithin muß die Glutaminsäure wieder zugegen sein; sie kann aber nicht durch Asparaginsäure ersetzt werden, und zudem muß sie noch durch Ammoniak ergänzt werden, um wirksam zu sein. Unter geeigneten Bedingungen läßt sich Glutaminsäure und Ammoniak durch Glutamin ersetzen. Es kann sich also hier nicht um eine reine Transaminierung handeln, wie bei der zweiten Teilstufe, da sonst die Rolle des  $\text{NH}_3$  nicht erklärt werden könnte. Der genaue Mechanismus der Reaktion ist noch unbekannt; aber wieder ist es die Glutaminsäure, die eine zentrale Stellung einnimmt. Wir wollen daher auf ihre allgemeine Bedeutung im Stoffwechsel kurz zu sprechen kommen.

## 2. Rolle der Glutaminsäure und des Glutamins

Die grundlegenden Versuche *Schoenheimers* [17] mit dem schweren Isotop des Stickstoffs haben den raschen Austausch des Aminostickstoffs zwischen verschiedenen Aminosäuren aufgedeckt. Wird signiertes Ammoniak verfüttert, so zeigt die Analyse der Gewebsproteine, daß von allen Aminosäuren die Glutamin- und Asparaginsäure, sowie die Fraktion des Amidstickstoffs den höchsten Gehalt an Isotop aufweisen. Auch bei Verfütterung N-signierter Aminosäuren tauschen wiederum die beiden Aminodicarbonsäuren ihren N am leichtesten aus. Diese Beobachtungen werden durch das besondere Verhalten der Glutamin- und Asparaginsäure bei der Transaminierung verständlich.

*Braunstein und Kritzmann* [16] zeigten schon früher, daß, wenn l-Glutaminsäure und Brenztraubensäure zu Leber- oder Muskelbrei gegeben werden, die  $\alpha$ -Aminogruppe der Glutaminsäure teilweise auf die Brenztraubensäure übergeht, wobei Alanin und  $\alpha$ -Ketoglutarsäure gebildet werden. Das System strebt einem Gleichgewichtszustand zu, der von beiden Seiten erreicht werden kann. Ein solcher Prozeß wird als *Transaminierung* bezeichnet. Die Glutaminsäure kann auch mit Oxalessigsäure, die Asparaginsäure mit Brenztraubensäure reagieren. Ob auch andere Aminosäuren an Transaminierungen beteiligt sind, ist eine offene Frage; auf alle Fälle haben sich wieder die Mono-amino-dicarbon-säuren als aktivste Substanz erwiesen. Im Vordergrund steht auch hier die Glutaminsäure. Da die Gewebe noch ein spezielles Ferment enthalten, die sogenannte Glutaminsäure-dehydrogenase, das in einer umkehrbaren Reaktion bei Gegenwart der Cozymase als Wasserstoffakzeptor die Glutaminsäure oxydativ desaminiert oder die  $\alpha$ -Ketosäure reduktiv aminiert, wird ihre dominierende Stellung abermals unterstrichen.

Das eine N-Atom des Harnstoffs stammt sicher aus der Glutaminsäure, die entweder durch Hydrolyse aus den Proteinen entsteht oder durch Transaminierung bzw. reduktive Aminierung aus  $\alpha$ -Ketoglutarsäure gebildet werden kann.

Die Glutaminsäure steht durch diesen raschen Mechanismus der Transaminierung mit dem Eiweißab- und aufbau einerseits und mit dem Tricarbonsäurecyclus anderseits in engster Beziehung.

Die Bedeutung des Glutamins für den tierischen Organismus wurde zum ersten Mal erkannt, als *Krebs* [74] seine Synthese aus Glutaminsäure und Ammoniak in der Niere nachwies. Auf seine besondere Stellung bei der Harnstoffsynthese haben wir bereits hingewiesen, auch bei der Hypoxanthinbildung soll es nach *Krebs* [18] wirksam sein. Die Versuche *Leuthardts* [19] über die Hippursäuresynthese in Gewebsschnitten zeigten, daß es wahrscheinlich in Glykokoll übergehen kann. Auch bei der Entgiftung der Phenyllessigsäure tritt das Glutamin an die Stelle des Glykokolls. *Van Slyke* u. Mitarb. [20] haben gezeigt, daß beim Hund das Glutamin die Muttersubstanz des Harnammoniaks ist. Weiter erbrachte *Hamilton* [21] den Nachweis, daß die Amidgruppe des

Glutamins einen bedeutenden Anteil des Nichteiweißstickstoffs des Blutes und der Gewebe ausmacht, und in den Versuchen *Schoenheimers* mit dem schweren Stickstoff wiesen, wie schon erwähnt, die Säureamide (Glutamin und Asparagin) einen besonders hohen  $N^{15}$ -Gehalt auf, ein Beweis, daß sie der Körper leicht zu bilden vermag.

Diese Tatsachen unterstreichen nochmals mit aller Deutlichkeit die wichtige Rolle des Glutamins als  $NH_3$ -Übermittler von Molekül zu Molekül oder von Organ zu Organ.

### 3. Citrullinbildung aus Ornithin

Wenn wir uns nun der Citrullinsynthese aus Ornithin zuwenden, so sind es vor allem zwei Fragen, die im Vordergrund stehen:

1. Wie geschieht die Addition des  $CO_2$  an das Ornithin?
2. Woher stammt das Ammoniak und wie wird es gebunden?

#### a) $CO_2$ -Fixation

Nach *Krebs* [22] entsteht durch Fixation des  $CO_2$  auf die  $\delta$ -Aminogruppe des Ornithins zuerst eine *Siegfried'sche* Carbonsäure und durch nachträgliche Fixation des  $NH_3$  entstünde daraus das Citrullin. Diese  $CO_2$ -Fixation ist nur möglich mit einer nicht ionisierten Aminogruppe. Die  $\delta$ -Aminogruppe ist aber bei physiologischen Bedingungen immer ionisiert. *Leuthardt* und *Glasson* [23, 24] konstatierten mit der Schnittmethode einen Einfluß des Pyruvats und eine Wirkung des Aneurins bei Vitamin  $B_1$ -freien Ratten auf die Harnstoffsynthese. Sie nahmen Fixierung des  $CO_2$  durch Carboxylierung des Pyruvats (Reaktion von *Wood* und *Werkmann* [25] zu Oxalacetat an mit nachfolgender Überführung der labilen  $\beta$ -Carboxylgruppe in das Säureamid. Dieses Säureamid der  $\beta$ -Ketonsäure sollte mit der  $\delta$ -Aminogruppe des Ornithins reagieren und so das Citrullin durch eine direkte Übertragung der präformierten  $CONH_2$ -Gruppe (Carbamylrest) auf das Ornithin entstehen lassen.

Neue Versuche haben diese Theorie fragwürdig erscheinen lassen. Wir werden darauf, wie auch auf die Herkunft des  $\text{CO}_2$ , bei der Besprechung unserer eigenen Versuche näher eingehen.

### b) *Herkunft des Ammoniaks*

Die wichtigsten Stickstoffquellen der Harnstoffsynthese sind letzten Endes die Aminogruppen der Eiweißbausteine. Es entsteht die Frage, auf welche Weise sie in den Krebs-Cyclus einbezogen werden, d. h., ob sie zuerst als Ammoniak abgespalten werden oder ob sie direkt durch Transaminierung eingeführt werden können. Die Harnstoffbildung nach Absorption von Aminosäuren oder verdautem Eiweiß hinkt zeitlich der maximalen Konzentration der Aminosäuren im Blut deutlich nach (*Leuthardt* und *Glasson* [26]). Würden die aufgenommenen Aminosäuren bei Eintritt in die Leber sofort desaminiert und der dabei frei werdende Ammoniak zur Harnstoffsynthese verwendet, so müßte das Maximum der Harnstoffbildung mit der maximalen Konzentration des Amino-N in der Leber und im Blut zusammenfallen. Die meisten Aminosäuren scheinen zunächst unverändert durch die Leber hindurchzugehen, um dann im intermediären Stoffwechsel zuerst in eine geeignete, besondere Form übergeführt zu werden. Möglicherweise kommt wieder das Säureamid des Glutamins in Frage.

Die Unentbehrlichkeit der Glutaminsäure und des Ammoniaks einerseits oder unter geeigneten Bedingungen des Glutamins andererseits, lassen vermuten, daß es sich auch hier nicht um einfache Addition von  $\text{NH}_3$  handelt, sondern um einen viel komplizierteren Vorgang, auf den wir im Zusammenhang bei der Erläuterung unserer Versuche zurückkommen werden.

## II. TEIL

### Fermente und ihre Lokalisation

#### 1. Schnitte und Gewebstreife

Nach den Untersuchungen von *Krebs* schien die Erhaltung der Gewebsstruktur für die Harnstoffsynthese unerlässlich. Der Ablauf der Fermentreaktion schien an die Integrität der lebenden Zelle gebunden.

Erst neue Versuchsanordnungen ermöglichten, die Schnitte durch den Gewebstreife zu ersetzen. Damit waren die Bedingungen gegeben, die einzelnen Fermentreaktionen losgelöst von der Zellstruktur zu studieren.

Ein weiterer Schritt war nun die Unterteilung dieses Gewebstreifes in eine lösliche und eine nicht lösliche Fraktion durch Zentrifugation. Natürlich wurden alle diese Manipulationen bei 0° vorgenommen, um so möglichst keine Inaktivierung und Denaturierung der empfindlichen Fermente zu bekommen.

Erst in neuerer Zeit ging man nun dazu über, die einzelnen durch Zentrifugation erhaltenen Fraktionen histologisch zu untersuchen, um die verschiedenen Fermente mit ihren entsprechenden anatomischen Substraten in Zusammenhang zu bringen. Es zeigte sich, daß viele der untersuchten Fermente an morphologisch gut definierte Bestandteile des Protoplasmas gebunden waren. Unter den Bestandteilen des Protoplasmas sind es vor allem die Mitochondrien und submikroskopischen Mikrosomen oder Chromidien (*Monné* [27]), die in diesem Zusammenhang genauer untersucht worden sind.

## 2. Mitochondrien

### a) Historischer Überblick

*Altmann* [28] sagt in seinen Studien über die Zelle: „Es zeigt sich, daß nur gewisse Schwierigkeiten der Methode zu überwinden sind, um in fast allen Zellgattungen echte Granula innerhalb der Zellenleiber nachzuweisen“.

*Benda* (1889) [29] konnte elektiv gefärbte Körner im Mittelstück der Mäusespermien darstellen, die er wegen ihrer Tendenz, Ketten zu bilden, Mitochondrien nannte.

*Meyers* [30] sah anders geformte Gebilde, die sich aber gegenüber den Färbemitteln gleich verhielten. Er nannte sie Chondriokonten. Mitochondrien und Chondriokonten wurden von ihm Chondriosomen und ihre Gesamtheit in der Zelle das Chondriom genannt. Derselbe Autor postulierte eine Teilung der Mitochondrien, sie erhalten sich durch Deszendenz. Auf Grund von hypothetischen Erwägungen über ihre funktionelle Bedeutung als „primitive, indifferente Anlagesubstanz, die im Laufe der Entwicklung die verschiedensten Differenzierungen in der Zelle epigenetisch ausbildet, wobei sie die elterlichen Eigenschaften in Erscheinung treten läßt“, wurden auch die Namen Plastosomen, Plastochondrien, Plastokonten für dieselben geformten Bestandteile verwendet. Die Mitochondrien wären nach ihm ein Erbfaktor, eine Ansicht, die von *Bensley* [31] bestritten wird, der sie als Komplexkoazervate bezeichnet.

Es ließ sich zeigen, daß die Chondriokonten mit den Filia *Flemings* (1882), die Mitochondrien mit den Granula *Altmanns* zum Teil identisch sind. Diese mehrmaligen Entdeckungen ein und derselben geformten Bestandteile des Protoplasmas hängen mit den verschiedenen Methoden der Fixation und der Färbung, die angewandt wurden, zusammen, denn wie andersartig und unter Umständen rasch wechselnd das morphologische Bild des Chondrioms ist, zeigt am besten die Lebendbeobachtung. *Michaelis* [32] u. a. wiesen schon vor ca. 50 Jahren als erste die Mitochondrien durch Vitalfärbung mit dem Janusgrün B nach. Nach übereinstimmenden Angaben von *Michaelis*, *Cowdry*, *Lewis*

etc. färben sich die Mitochondrien in den lebenden Zellen elektiv mit dem Janusgrün B. Dieser Farbstoff ist verhältnismäßig giftig. Es genügen Konzentrationen von 1:10 000 und 1:50 000.

b) *Morphologie, Vorkommen, chemische Zusammensetzung*

Bei der großen Labilität der Plastosomen gegenüber allen Milieuveränderungen kann es nicht wundernehmen, daß ihre naturgetreue Fixierung sehr schwierig ist. *Guillérmond* [33] hat Vergleiche zwischen lebendem und fixiertem Material angestellt, aus dem hervorgeht, daß nur die Methoden von *Altmann* [34], *Benda* und *Regand (Romeis)* [35] einigermaßen die naturgetreue Form der Plastosomen erhalten.

Beim Studium des Milieueinflusses auf die Mitochondrien beobachteten *M. u. W. Lewis* [36], *Bang* und *Sjövall* [37] etc. ein Anschwellen der Plastosomen in hypotonischen Lösungen. Sie haben auch den Einfluß von Chemikalien geprüft. Alle diese Versuche sind in neuerer Zeit wieder aufgenommen worden mit Hilfe des Phasen-Kontrastmikroskopes, das sich für die Lebendbeobachtung ganz ausgezeichnet eignet. Es kann in sehr eleganter Weise der Einfluß von Lösungen, Alkali, Säuren etc. gezeigt werden.

*Zollinger* [38] zeigte anhand von schönen Untersuchungen mit Nierenmitochondrien den Einfluß des Milieus. In einem hypotonischen NaCl-Milieu oder bei Zugabe von destilliertem Wasser schwellen die Mitochondrien sphärisch an, sie trinken das Wasser. *Meltzer* [39] prägte den Ausdruck der *Potocytose*. Man gewinnt aber den Eindruck, daß der eigentliche Mitochondrien-Körper dieselbe Dichte bewahrt und daß sich das Wasser zwischen ihn und eine Membran schiebt durch eine Art oberflächlicher Blasenbildung. Der Mitochondrienkörper erscheint dann am Rand des Kreises als sichelförmiges Gebilde. Eine hypertonsche NaCl-Lösung bringt solche Mitochondrien wieder zum Schrumpfen, aber nur vorübergehend, da sie nachher wieder anschwellen, was sehr wahrscheinlich als Folge einer irreversiblen Schädigung der Membran durch den starken Elektrolyten angesehen werden kann. *Zollinger* hat auch den Einfluß anderer Substanzen wie Alkohol, Aceton etc. untersucht. Nach seinen Untersuchungen

bestehen die Mitochondrien aus einer elastischen Membran und einem Inhalt, der gewöhnlich in Gelform vorliegt. Bei der Aufnahme von Wasser tritt es zwischen die abgehobene Membran und den eigentlichen Mitochondrienkörper. Die Potocytose ist nach ihm ein Vorgang, der nur bei den lebenden Mitochondrien auftritt, die aus ihrer natürlichen Umgebung entfernt worden sind. Sowohl Osmose als Permeabilität spielen dabei eine Rolle. Auch *Claude* [40] lieferte mit dem Elektronenmikroskop den Nachweis einer Membran.

Über das Vorkommen der Mitochondrien kann gesagt werden, daß sie im allgemeinen umso zahlreicher sind, je jünger die Zelle ist, während ausdifferenzierte, ältere Zellen weniger enthalten. Eine Ausnahme bilden die reifen Geschlechtszellen, die sehr reich an Mitochondrien sind. Es zeigt sich auch, daß die Mitochondrien mit dem Ernährungszustand der Zelle zusammenhängen. Beim wohlernährten Tier liegen sie in der länglichen, beim hungernden Tier in der runden Form vor.

Über das Verhalten der Mitochondrien gegenüber verschiedenen Reagentien hat man folgende Beobachtungen gemacht: Sie sind fast immer löslich in Alkohol, Äther, Chloroform, Xylol, ferner in verdünnter Essigsäure, einfach lichtbrechend, färben sich nicht mit Sudan III und Scharlachrot und schwärzen sich nur ausnahmsweise mit  $\text{OsO}_4$ . Auf Grund dieser Reaktionen nahm man an, daß ein Phosphatid vorhanden ist. Daneben scheint auch ein Albumin als Eiweißkomponente an ihrem Aufbau beteiligt zu sein. Sicher wird der prozentuale Anteil der Phosphatide und Proteine in den verschiedenen Zellarten ein wechselnder sein [41].

Über ihre genaue chemische Zusammensetzung haben uns in neuerer Zeit vor allem die Untersuchungen an isolierten Mitochondrien genaueren Aufschluß gebracht. Die durch Zentrifugation erhaltenen Fraktionen wurden durch *Claude* [42] und *Schneider* [43] auf ihren Gehalt an Nucleinsäuren untersucht. Es zeigte sich, daß der Zellkern die gesamte in der Zelle vorhandene Desoxyribose-nucleinsäure enthält neben einem gewissen Prozentsatz von Pentose-nucleinsäure, deren Hauptanteil sich aber in den sogenannten submikroskopischen Teilchen findet, die nur bei hohen Tourenzahlen aus zentrifugiert werden können. Die Mitochondrien

enthalten gleichfalls einen kleinen Prozentsatz von Pentosenucleinsäure neben Phospho-Lipoiden und Phospho-Proteinen.

Zusammenfassend trifft auch heute noch die von *Cowdry* [44] schon 1918 trefflich formulierte Definition zu:

Die Chondriosomen sind Zellgranulationen, die wir einstweilen als Substanzen definieren können, die in Form von Körnchen, Stäbchen oder Fäserchen in den meisten lebenden Zellen auftreten, die mit Janusgrün positiv reagieren und in ihrem Verhalten Lösungsmitteln gegenüber sowie in ihren Farbreaktionen den Phospho-lipoiden und Albuminen ähneln.

### c) *Darstellung von Mitochondriensuspensionen*

Nach dieser kurzen Übersicht ihrer Morphologie wollen wir uns der Herstellung der reinen Mitochondriensuspensionen zuwenden. *Claude* [45] hat in schönen Versuchen durch fraktionierte Zentrifugation einen Weg gewiesen, um mehr oder weniger reine Mitochondriensuspensionen, die sogenannte *large granule fraction* zu erhalten, eine Methode, die auch schon von *Bensley* [31, 46] angewandt wurde. Nach *Claude* setzen sich diese *large granule fractions* aus Mitochondrien und *secretory granules* zusammen.

Bei niederen Tourenzahlen und nur kurzer Zentrifugation des Homogenates werden die Zellresten, Zellkerne und Erythrocyten entfernt; dann, bei einer Zentrifugalbeschleunigung von 2000 g (g = Schwerebeschleunigung) und halbstündiger Zentrifugation, sedimentieren die *large granules* und bei sehr hochtouriger Zentrifugation werden sogar die Mikrosomen zur Sedimentation gebracht. *Potter* [47], der Wasser anstelle von isotonischen Lösungen nimmt, *Hogeboom* u. Mitarb. [48] und *Schneider* [49] gehen bei ihren Zentrifugationen ungefähr gleich vor. Da sämtliche auf diese Weise gewonnenen Mitochondrien agglutinieren und sphärisch anschwellen, also nicht die längliche Form aufweisen wie in der intakten Zelle, und sich nicht durch Janusgrün anfärben lassen, gingen *Hogeboom* u. Mitarb. [50] dazu über, an-

stelle von Elektrolyten einen Nichtelektrolyten, die Saccharose, zu verwenden. Schon *Guillérmond* [33] konnte zeigen, daß das Pflanzenchondriom bei Verwendung einer isotonischen Saccharoselösung am besten erhalten bleibt. Um das sphärische Anschwellen sehr wahrscheinlich durch Osmose der Mitochondrien zu verhindern, verwendeten sie eine hypertonische Lösung. Es gelang ihnen auf diese Weise durch ähnliche fraktionierte Zentrifugation eine sozusagen reine Suspension von länglichen, mit Janusgrün färbbaren Mitochondrien zu erhalten. Um morphologisch intakte Mitochondrien zu isolieren, muß also eine hypertonische Lösung eines Nichtelektrolyten verwendet werden.

Diese mehr oder weniger reine Suspension konnte nun auf ihren Fermentgehalt untersucht werden, denn es ist eine alte Vermutung, daß die Mitochondrien mit dem Fermentstoffwechsel in Verbindung stehen. Das erste Enzym, das in den Mitochondrien der Amöbe gefunden wurde, dürfte die Amylase sein [51]. Dann ist vor allem die Cytochromoxydase und die Succinoxidase und das Cytochrom C in den isolierten Plastosomen durch die oben erwähnten Autoren [48—50] untersucht worden. Schon *Shapiro* vermutete die Lokalisation der Cytochromoxydase in den granules anhand seiner Versuche mit den stratifugierten Eizellen (*Brachet* [52]). *Lehninger* u. Mitarb. [53] und gleichfalls *Schneider* [54] lokalisierten die Oxydation der höheren Fettsäuren (n-Octylsäure) in den Mitochondrien; auch die „Cytochromase“ (das Fermentsystem, das Pyruvat nach dem Tricarbonsäurecyclus oxydiert) scheint an sie gebunden zu sein (*Green* u. Mitarb. [55]).

Diese Beispiele sollen genügen, um zu zeigen, welch kompliziertes Gebilde wir in den Mitochondrien vor uns haben und zu welchen chemischen Umsetzungen sie befähigt sind.

### III. TEIL

## Versuche

#### 1. Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns zum Ziele gesetzt, die bei der Umwandlung des Ornithins in das Citrullin auftretenden chemischen Reaktionsmechanismen genauer zu untersuchen und die daran beteiligten Fermente zu lokalisieren.

Das eigentliche Studium der biologischen Citrullinsynthese konnte erst wieder angegangen werden, nachdem es *Cohen* und *Hayano* [4, 56] mit dem intakten Leberhomogenat der weißen Ratte gelungen war, den Ornithincyclus auf der Stufe des Citrullins zu unterbrechen, d. h. den ersten Schritt der Harnstoffsynthese, die Bildung des Citrullins aus dem Ornithin, von der zweiten Etappe, der Umwandlung des Citrullins in das Arginin, abzutrennen. Eine noch eindeutigere Trennung der beiden Teilstufen wird durch Zentrifugation des Gewebsbreies erreicht, wobei das Fermentsystem, welches die Synthese bewirkt, in der abzentrifugierten Fraktion des Homogenates, dem sogenannten Rückstand, enthalten ist. Für die weitere Umwandlung des Citrullins in das Arginin ist dieser Rückstand und das Überstehende erforderlich.

Der größte Teil unserer Versuche in der vorliegenden Arbeit wurde mit diesem Rückstand ausgeführt, dessen genauere Herstellung im experimentellen Teil ausführlich beschrieben wird.

Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, daß zur Citrullinsynthese aus Ornithin außer  $\text{CO}_2$  auch Glutaminsäure und Ammoniak unentbehrlich sind. Auf Grund dieser Feststellung lag es nahe, die Glutaminsäure und das Ammoniak durch Glutamin zu ersetzen, dessen Einfluß auf die Harnstoffsynthese ja schon durch frühere Versuche (*Leuthardt*) feststand.

Wir haben nun die Frage untersucht, ob das Glutamin in irgend einer Weise an der Reaktion teilnimmt. Wir konnten zeigen, daß unter gewissen Bedingungen Glutamin die Glutaminsäure und Ammoniak ersetzen kann, ja, daß bei geeigneter Versuchsanordnung die Citrullinsynthese in Gegenwart von Glutamin (auch bei Abwesenheit von Ammoniak) bedeutend höhere Ausbeuten gibt als bei Glutaminsäure und Ammoniakzusatz. Wahrscheinlich kann aber das Amid trotzdem nicht als Zwischenstufe der Synthese angesehen werden, worauf wir bei der Diskussion unserer Resultate noch zu sprechen kommen werden.

Ein Hauptproblem der Citrullinsynthese ist die Fixierung des  $\text{CO}_2$ . Einleitend haben wir die Frage bereits gestreift und auf die Komplexität des Vorganges hingewiesen. Die Tatsache, daß außer  $\text{CO}_2$  auch Glutaminsäure unentbehrlich ist, legt den Gedanken nahe, daß  $\text{CO}_2$  nicht direkt mit dem Ornithin reagiere, sondern zuerst in Form eines Glutaminsäurederivates fixiert werde. Es käme dann sekundär zu einer Übertragung einer vorgebildeten Carbamylgruppe, ähnlich der Amidinverschiebung bei der Kreatinsynthese. Von diesen Überlegungen ausgehend, haben wir das Verhalten der  $\alpha$ -Ureidoglutarsäure untersucht. Es hat sich gezeigt, daß in der Tat aus  $\alpha$ -Ureidoglutarsäure und Ammoniak und Ornithin Citrullin gebildet wird, aber nur, wenn gleichzeitig Fumarat zugegen ist. Vor Abschluß dieser Versuche erschien eine Mitteilung von *Cohen und Grisolia* [57], in welcher, offenbar von ähnlichen Gedanken ausgehend, das Verhalten der  $\alpha$ -Ureidoglutarsäure eingehend untersucht wurde. Wir werden bei der Besprechung unserer Ergebnisse kurz darauf zurückkommen.

Im Verlaufe unserer Versuche beobachteten wir, daß durch mehrmaliges Auswaschen unseres Rückstandes mit einer isotonischen Kaliumchloridlösung eine Verschiebung der Citrullinausbeutung eintrat, in dem Sinne, daß Glutamin der Glutaminsäure und Ammoniak zusehends stärker überlegen wurde in seiner Eigenschaft als Citrullinbildner. Anfänglich vermuteten wir, daß im Verlauf dieser Auswaschungen vielleicht irgend etwas entfernt würde, das eine Hemmwirkung ausübte. Wir gingen deshalb dazu über, diesen Rückstand, der morphologisch sehr heterogener Natur war, weiter zu reinigen. Angeregt durch die Arbeiten von

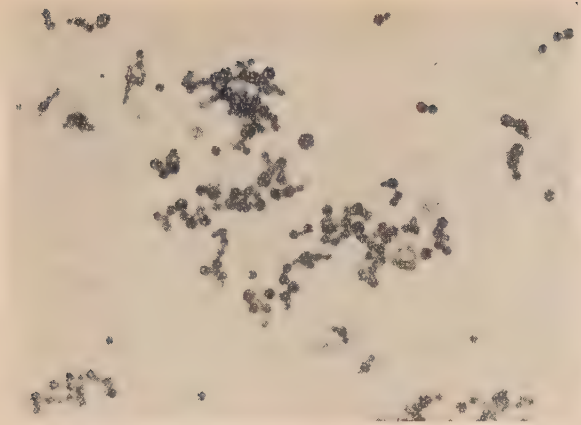


Abb. 1. Ausstrich einer aktiven Suspension.

Vergrößerung 1500mal. Osmiumfixierung. Färbung mit Anilinsäurefuchsin  
nach *Altmann*.

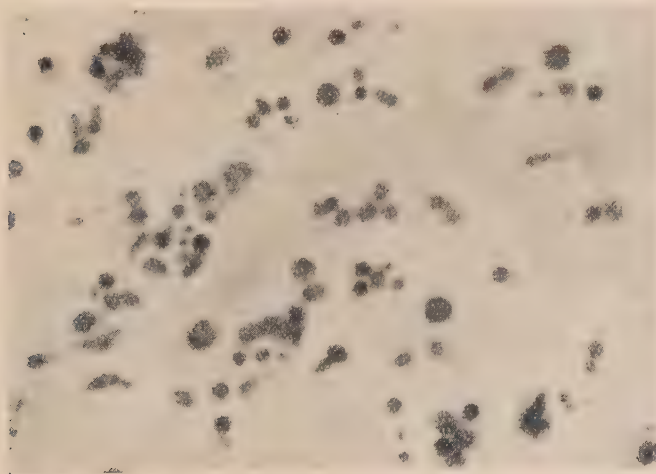


Abb. 2. Lebendbeobachtung einer aktiven Suspension im Phasen-Kontrast-  
mikroskop.

Vergrößerung 2000mal.

*Claude* u. a. [45—50], denen es gelungen war, durch fraktionierte Zentrifugation mehr oder weniger reine Fraktionen von Kernen, Mitochondrien, Mikrosomen, zu erhalten, versuchten auch wir, unseren Rückstand, der sich aus wenigen intakten Zellen, Zellkernen und Erythrocyten, sowie aus Protoplasma mit geformten Bestandteilen zusammensetzt, soweit zu unterteilen, um eine möglichst reine Mitochondriensuspension zu erhalten, da wir vermuteten, daß die zur Citrullinsynthese befähigten Fermente in ihnen lokalisiert seien.

Die hauptsächlichste Schwierigkeit, die sich in der Abtrennung der Mitochondrien von den übrigen Zellbestandteilen entgegenstellt, liegt in ihrer Agglutination durch Elektrolytlösungen. Saccharoselösung, die von den amerikanischen Autoren [50] verwendet wurde, besitzt diese Eigenschaft nicht. Sie war aber in unserem Falle deshalb ungeeignet, weil sie bei der Citrullinbestimmung nach der Methode von *Gornall* u. *Hunter* und *Archibald* eine unspezifische Gelbfärbung gibt, welche die kolorimetrische Bestimmung verunmöglicht. Es mußte daher ein anderer Nichtelektrolyt gesucht werden. Wir fanden, daß Mannit, ein Hexit, sich eignet und bei der Citrullinbestimmung nicht stört. Die genaue Beschreibung der Aufarbeitung einer Mitochondriensuspension erfolgt im experimentellen Teil.

Die histologische Untersuchung unseres Fermentpräparates läßt erkennen, daß die Suspension aus Körperchen verschiedenen Durchmessers von der Grenze der Auflösbarkeit bis zu etwa  $2\ \mu$  besteht, die sich mit Janusgrün, das sich ja elektiv auf die Mitochondrien fixiert, anfärben lassen. Auch durch Anilin-Säurefuchsin-Färbung nach *Altmann* nach vorheriger Fixierung in 2-proz.  $\text{OsO}_4$  können sie dargestellt werden. Es handelt sich also ohne Zweifel um Mitochondrien. Der Ausstrich eines aktiven Präparates zeigt, daß eine annähernd reine Suspension vorliegt mit vereinzelt Fettröpfchen und ganz wenigen Erythrocyten und Leberzellkernen (Abb. 1). Im Phasen-Kontrastmikroskop erscheinen die Mitochondrien als Kügelchen, was als Zeichen einer beginnenden Wasseraufnahme (Potocytose) gedeutet werden kann (Abb. 2). In der unveränderten Zelle hingegen zeigen sie eher längliche Formen. Wir führen diese Andeutung einer

einsetzenden Schädigung auf die Verwendung von isotonischen Elektrolyten (anstelle von hypertonen Nichtelektrolyten) während der ersten Phase der Darstellung zurück. Eine Reihe von Kontrollversuchen hat uns gezeigt, daß mit reinen Mitochondriensuspensionen die gleichen Resultate erhalten werden wie mit dem ungereinigten, heterogenen Homogenat, nur sind die Umsätze pro mg Stickstoff bei Verwendung reiner Mitochondrien bedeutend höher. Wir sind also berechtigt anzunehmen, daß die biologische Citrullinsynthese in den Leberzellen im Chondriom lokalisiert ist.

Unsere Versuche sind ein erneuter Hinweis auf die große Bedeutung, die den Mitochondrien für die chemischen Umsetzungen in der Zelle zukommt.

## 2. Experimenteller Teil

### *Tiermaterial*

Es wurden optimal ernährte Albinoratten hauptsächlich männlichen Geschlechts im Gewicht von 150—200 g verwendet. Vor dem Versuch wurden die Tiere 48 Stunden auf Hunger gesetzt.

### *Herstellung des Homogenats*

Alle im folgenden beschriebenen Operationen wurden bei 0° (unter Eiskühlung und in der Kältezentrifuge) vorgenommen. Die Lebern wurden nach der Entnahme auf Eis gekühlt. Eine abgewogene Menge wurde im Apparat von *Potter* und *Elvehjem* [3] gewöhnlich in 3 Teilen des Salzgemisches (isotonische KCl-Lösung oder isotonisches Gemisch von KCl und 0,017 m Phosphatpuffer  $p_H$  6,7) homogenisiert; in einzelnen Fällen wurde das Phosphat weggelassen. Der Apparat von *Potter* und *Elvehjem* besteht aus einem dickwandigen Reagensglas mit eingeschliffenem Glaspistill, das direkt auf die Achse eines Elektromotors aufgesetzt und mit ca. 3000 Umdrehungen pro Minute rotiert wird. Das Pistill trägt am unteren Ende einige Zähnnchen und ist so gut eingeschliffen, daß zwischen ihm und der Innenwand des Reagensglases nur ein ganz dünner Spalt frei ist. Das Organ wird in kleine

Stückchen zerschnitten, gewogen und mit dem Salzmilieu in das Reagensglas gebracht. Das Pistill wird eingeführt und in Rotation versetzt. Durch Heben des (eisgekühlten) Reagensglases wird das Organ durch den Spalt zwischen der Glaswand und dem rasch rotierenden Pistill gepreßt und dabei zu einem homogenen Brei zerrieben. Leber ist nach ca. einer Minute vollständig zu einem Brei homogenisiert. Das Homogenat wird dann durch zwei Schichten Gaze koliert.

Wir haben festgestellt, daß bei Verwendung von nicht gepufferter isotonischer KCl-Lösung während der Auswaschungen  $p_H$ -Änderungen eintreten, die in verschiedenen Homogenaten beträchtliche Schwankungen aufwiesen (Messung mit der Glaselektrode). Wir haben daher, wie angegeben, in einigen Versuchen der KCl-Lösung schon beim Homogenisieren Phosphatpuffer zugesetzt; der  $p_H$ -Wert des Fermentpräparates bleibt unter diesen Bedingungen konstant. Da eine Erhöhung der Phosphatkonzentration in den Ansätzen eine Hemmung der Citrullinsynthese bewirkt, wurde bei diesen Versuchen darauf geachtet, daß der Gesamtgehalt der Ansätze an Phosphat nicht erhöht wurde.

### *Herstellung des Fermentpräparates*

Das Homogenat wurde nach den Angaben von *Cohen* und *Hayano* [56] 10 Minuten bei ca. 2000 g (Zentrifugalbeschleunigung 2000  $\times$  Erdbeschleunigung) zentrifugiert, das Überstehende verworfen und der Rückstand mit isotonischer KCl-Lösung oder isotonischem Gemisch von KCl + 0,017 m Phosphatpuffer aufgenommen und zum ursprünglichen Volumen ergänzt. Nach gutem Vermischen wurde erneut 5 Minuten bei 2000 g zentrifugiert und der Niederschlag wieder auf das ursprüngliche Volumen gebracht. Diese Suspension bezeichnen wir im folgenden als einmal gewaschenes Ferment. Ein solches Fermentpräparat ist, wie schon einleitend bemerkt wurde, nur befähigt, Ornithin in Citrullin umzuwandeln, d. h. die Reaktion steht beim Citrullin still; es wird kein Arginin gebildet.

Wenn von  $n$ -mal gewaschenem Ferment die Rede ist, so bedeutet dies, daß die eben beschriebene Prozedur des 5 Minuten

langen Auszentrifugierens bei 2000 g und das Wiederaufnehmen im ursprünglichen Volumen Salzlösung n-mal wiederholt wurde. Die Anzahl der Auswaschungen, die von verschiedenen Präparaten ohne wesentliche Abnahme der Aktivität ertragen werden, ist starken individuellen Schwankungen unterworfen. Im Verlaufe mehrerer Zentrifugierungen tritt allmählich eine Trennung des Niederschlages in zwei Schichten in Erscheinung: eine untere hellrote und eine obere weißliche. Wir unterbrachen das Auswaschen, sobald diese Schichten sich deutlich voneinander absetzten. Die Erfahrung zeigte, daß bei weiter fortgesetztem Auswaschen die Aktivität der Präparate rasch abnahm.

### *Herstellung der Mitochondriensuspension*

Im späteren Verlauf unserer Untersuchungen gelang es uns nachzuweisen, daß der wirksame Bestandteil unserer Präparate die Mitochondrien sind. Wir haben bei ihrer Abtrennung von den übrigen Zellbestandteilen uns an die Angaben von *Hogeboom* u. Mitarb. [50] gehalten, die Saccharose aber aus den schon erwähnten Gründen durch Mannit ersetzt. Wir sind dabei folgendermaßen vorgegangen:

20 ccm eines auf die übliche Weise im Apparat von *Potter* und *Elvehjem* unter Eiskühlung in isotonischer KCl-Lösung bereiteten 25 % Leberhomogenats der Ratte wurden 10—15 Minuten in der Kältezentrifuge bei 1500—2000 g zentrifugiert und das Überstehende verworfen. Der Rückstand wurde im halben ursprünglichen Volumen mit 5,75-proz. Mannitlösung (isotonisch) aufgenommen, nochmals 10 Minuten unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert und das gelblich klare Überstehende abermals verworfen. Der Rückstand wurde erneut in etwa 6 ccm Mannit aufgenommen, 3—5 Minuten zentrifugiert (2000 g). Es hat eine Trennung der festen Bestandteile stattgefunden: der gut absitzende Rückstand, der die Erythrocyten, intakten Zellen und Leberzellkerne enthält, ist hellrot gefärbt. Das Überstehende stellt eine milchig weiße, homogene Suspension dar. Der Rückstand wird noch 2—3 mal während je einer Minute mit ca. 2 ccm Mannitlösung gewaschen. Die weißliche Waschflüssigkeit wird zum

Überstehenden gegeben, das dann die Hälfte des initialen Homogenates ausmacht. Die histologische Untersuchung zeigte, daß es sich um eine annähernd reine Mitochondriensuspension handelt.

Da uns keine genügend schnelle Kältezentrifuge zur Verfügung stand, waren wir gezwungen, die initiale Zentrifugation mit einem Elektrolyten auszuführen, um so möglichst alle Mitochondrien, die ja unter diesen Bedingungen agglutinieren, auszuschleudern und so von den löslichen und schwer zentrifugierbaren Bestandteilen zu trennen. Nahmen wir hingegen von Anfang an Saccharose oder Mannit, so war es uns mit unserer Zentrifuge nicht möglich, sämtliche Mitochondrien zu sedimentieren.

*Vitalfärbung* mit Janusgrün (Dimethyl-2-7-phenyl-10-amino-3-(dimethyl-amino)-4-benzolazo-6-phenanzonium-10-Chlorid)

Ein Tropfen der Mitochondriensuspension und ein Tropfen der verdünnten Janusgrünlösung (1:20 000) werden auf ein Deckglas gegeben, 20—30 Minuten in einer feuchten Kammer an der Luft stehengelassen und dann erst ein Deckglas darauf gelegt. Die Färbung muß unter freiem Luftzutritt erfolgen (vgl. *Romeis* [35]).

### *Fixierung*

Mitochondriensuspension und 4%  $\text{OsO}_4$  werden zu gleichen Teilen gemischt und 24 Stunden bei 0° gut verschlossen stehen gelassen. Der Ausstrich wird dann mit Alanin-Säurefuchsin unter 1—2-maligem Erhitzen gefärbt (*Altmann'sche Methode*).

### *Milieu und Versuchsdauer*

Als Milieu dient, wenn nichts anderes bemerkt ist, 0,017 m Phosphatpuffer und KCl, das bis zur Isotonie der Gesamtlösung zugesetzt wurde. Gesamtvolumen 3 ccm (wenn nichts anderes vermerkt). Gasatmosphäre 95 %  $\text{O}_2$  + 5 %  $\text{CO}_2$ . Die Ansätze werden in 25 ccm-Erlenmeyerkölbchen während 30 Minuten im Wasserbad bei 38° geschüttelt.

## Substanzen

Die meisten verwendeten Produkte wurden von *F. Hoffmann-La Roche & Co. AG.*, Basel, bezogen; Oxalacetat wurde aus dem Natriumsalz des Diäthylesters nach *Krampitz* und *Werkmann* [58] bereitet,  $\alpha$ -Ketoglutarsäure nach *Wislicenus* und *Waldmüller* [59], Glutamin aus Rübensaft nach *Vickery* u. Mitarb. [60];  $\alpha$ -Ureidoglutarsäure wurde aus 1(—)-Glutaminsäure und K-Cyanat nach bekannten Methoden dargestellt. Elementaranalyse:

|      |        |        |           |
|------|--------|--------|-----------|
| Gef. | C 37,9 | H 5,12 | N 14,72 % |
| Ber. | C 37,9 | H 5,26 | N 14,75 % |

Cytochrom C wurde aus Pferdeherz nach *Keilin* und *Hartree* [61] gewonnen; A.T.P. wurde nach *Needham* [62] unter Berücksichtigung der Angaben von *Le Page* [63] bereitet.

Janusgrün verdanken wir der Freundlichkeit von Herrn Prof. Dr. *G. Töndury*, Direktor des Anatomischen Instituts der Universität Zürich, dem wir bei dieser Gelegenheit bestens danken möchten.

## Analytische Methoden

**Citrullinbestimmung** nach *Archibald* [64]. Kolorimetrische Ablesung im ZeiBphotometer (Filter S 50). 15 Minuten Erhitzen im siedenden Wasserbad und 10 Minuten Abkühlen im kalten Wasser. Beides unter Lichtabschluß. Es wurden jedesmal vier bekannte Citrullinkonzentrationen mitgeführt. Durch geeignete Verdünnung wurde erreicht, daß in dem zur Bestimmung verwendeten Volumen Lösung immer zwischen 15 und 35  $\gamma$  Citrullin vorhanden war.

Die Reaktion von *Fearon* [65] (Bildung eines gelbroten Farbstoffes mit Diacetylmonoxim), die der Citrullinbestimmung von *Gornall* und *Hunter* und von *Archibald* zugrunde liegt, gibt zwar unter den bekannten im tierischen Gewebe vorkommenden Stoffen nur bei Citrullin und beim Harnstoff eine hohe Farbintensität; sie ist aber keineswegs eine spezifische Reaktion für das Citrullin. Wir haben deshalb in einigen Versuchen das gebildete Citrullin noch auf biochemischem Wege zu identifizieren versucht, indem

wir am Versuchsende frisches, vollständiges Leberhomogenat und Glutaminsäure zusetzten. Unter diesen Bedingungen wird das angehäuften Citrullin durch die Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* in Arginin und weiter in Harnstoff übergeführt. Die erhaltenen Mengen Harnstoff waren innerhalb der Fehlergrenzen den parallel dazu kolorimetrisch bestimmten Mengen „Citrullin“ äquivalent. Wenn man nicht annehmen will, daß ein unbekannter Körper gebildet wird, der sowohl die Farbreaktion des Citrullins gibt als auch in Gegenwart von Glutaminsäure Arginin bildet, so sprechen diese Versuche für die Identität des kolorimetrisch bestimmten Körpers mit dem Citrullin.

**Argininbestimmung.** Wegen des hohen Arginasegehaltes des Leberhomogenats wird Arginin rasch zu Harnstoff und Ornithin gespalten. Der Harnstoff wurde manometrisch nach *Krebs* und *Henseleit* [2] mittels „Arlco“-Urease bestimmt.

Glutamin wurde nach den Angaben von *Leuthardt* und *Bujard* [66] bestimmt, wonach die Lösung mit Permutit vorbehandelt und sodann bei  $p_H$  6,5 während 2 Stunden im siedenden Wasserbad erhitzt wird. Das Ammoniak wurde nach *Sobel* u. Mitarb. [67] im Luftstrom destilliert und in Borsäure aufgefangen.

### 3. Ergebnisse

#### a) Vergleich von Glutaminsäure und Glutamin

*Cohen* und *Hayano* haben gefunden, daß Zusatz von Hydrogencarbonat und Ammoniumsalzen nicht genügen, um im zentrifugierten Homogenat Ornithin in Citrullin überzuführen. Es muß Glutaminsäure zugegen sein. Wir können die Angaben der genannten Autoren in allen Teilen bestätigen. Die Citrullinsynthese kann also nicht wie die Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* auf einer einfachen Transaminierung beruhen, an der die Glutaminsäure beteiligt ist. Die weitere Verfolgung der Reaktion zeigte, daß man das Ammoniumglutamat durch Glutamin ersetzen kann. Ein typischer Versuch ist in Fig. 1 dargestellt. Aus den Kurven ist ersichtlich, daß bei den höheren Substratkonzentrationen sowohl das

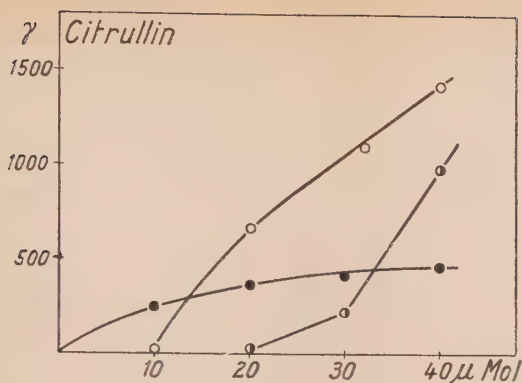


Fig. 1. Citrullinsynthese bei Gegenwart von Glutaminsäure oder Glutamin.

Alle Ansätze (Gesamt volumen 3 ccm) enthalten Ornithin (0,0033 m),  $\text{NaHCO}_3$  (0,0135 m), Adenosintriphosphat (0,001 m),  $\text{MgSO}_4$  (0,01 m), Phosphatpuffer ( $\text{pH}$  7,0, 0,0085 m). Homogenat mit isotonischem Gemisch von  $\text{KCl}$  + 0,017 m Phosphatpuffer von  $\text{pH}$  6,7 bereitet. 0,5 ccm in 3 ccm. Gasatmosphäre Sauerstoff + 5 Vol.-%  $\text{CO}_2$ . Versuchsdauer 30 Min., Temperatur 38°. Abszisse: Konzentration der Glutaminsäure oder des Glutamins in  $\mu$  Mol pro Ansatz. Ordinate: Citrullinsynthese in  $\gamma$ . ● bei Gegenwart von Glutaminsäure +  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,0033 m). ○ Glutamin (ohne Zusatz).

○ Glutamin +  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Konzentration wie bei der Glutaminsäure).

Glutamin allein als auch das Glutamin mit Ammoniumsalz bedeutend mehr Citrullin liefern als die Glutaminsäure. Bei Abnahme der Substratkonzentration sinkt aber die Wirksamkeit des Glutamins rasch ab, und bei sehr kleiner Konzentration ist die Glutaminsäure immer überlegen. Asparagin anstelle des Glutamins zugesetzt ist ganz unwirksam.

Bei mehrfachem Auswaschen des Homogenats nimmt seine Aktivität gegenüber Ammoniumglutamat ab, dagegen bleibt die Aktivität gegenüber Glutamin annähernd konstant (dieses Verhalten wird durch Fig. 2 belegt). Mit dem Auswaschen sinkt der N-Gehalt des Homogenats. Die Aktivität pro mg N nimmt daher auch gegenüber Ammoniumglutamat während der ersten Auswaschung tatsächlich zu. Nach unserer Erfahrung ist aber der N-Gehalt keine sichere Vergleichsbasis für die Aktivität der Präpa-

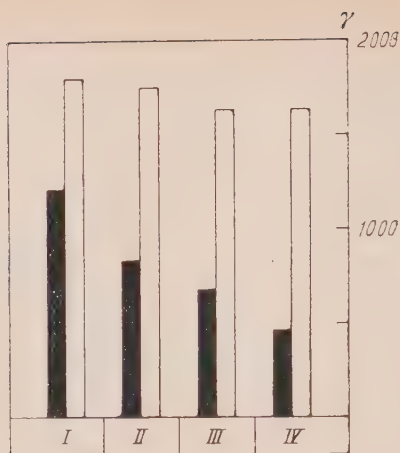


Fig. 2. Auswascheffekt.

Homogenat, Gesamtvolumen, Gasatmosphäre, Versuchsdauer, Temperatur, Ornithin,  $\text{NaHCO}_3$ , Adenosintriphosphat,  $\text{MgSO}_4$ , Phosphatpuffer wie im Versuch Fig. 1. Glutaminsäure, Glutamin (0,0166 m),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,0033 m). Citrullinbildung in %. Schwarze Säulen: in Gegenwart von Glutaminsäure +  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; weiße Säulen: in Gegenwart von Glutamin (ohne  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). I, II, III, IV: das Homogenat wurde 1-, 2-, 3-, 4mal ausgewaschen (vgl. S. 26).

rate. Wir können daher nicht mit Sicherheit angeben, ob die allmähliche Verschiebung der Aktivität zugunsten des Glutamins im Verlauf des Auswaschens auf der Entfernung von Faktoren beruht, welche die Reaktion der Glutaminsäure begünstigen, oder von solchen, welche die Reaktion des Glutamins hemmen.

Die Konzentration, bei der das Glutamin, respektive das Glutamin + Ammoniak ebensoviel Citrullin gibt wie das Ammoniumglutamat, ist bei verschiedenen Fermentpräparaten etwas verschieden. Sie liegt aber für Glutamin und Ammoniak meist zwischen 3–6  $\mu$  Mol/ccm, für Glutamin ohne Ammoniak bei 10–15  $\mu$  Mol/ccm.

Die geringe Wirksamkeit des Glutamins bei kleinen Konzentrationen könnte darauf beruhen, daß das Amid durch eine sekundäre Reaktion rasch verbraucht würde. Dies ist aber nicht der Fall. Die direkte Bestimmung des am Versuchsende noch vorhan-

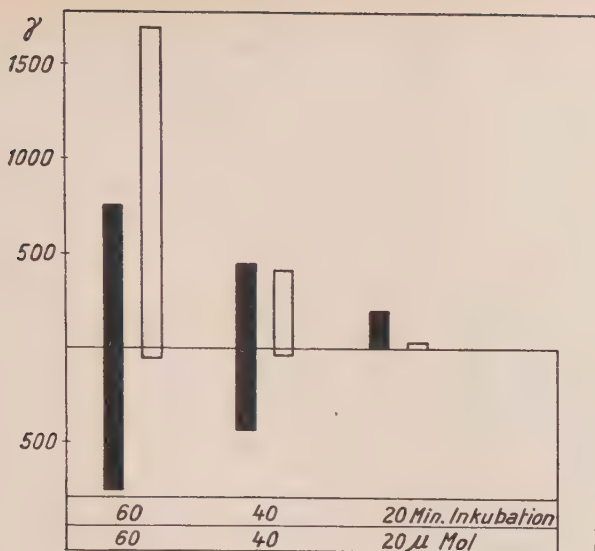


Fig. 3. Fraktionierte Substratzugabe.

0,5 ccm Homogenat (in isotonischer KCl-Lösung). Gesamtvolumen, Gasatmosphäre, Temperatur, Ornithin,  $\text{NaHCO}_3$ , Adenosintriphosphat,  $\text{MgSO}_4$  wie im Versuch Fig. 1. Phosphatpuffer ( $\text{pH}$  7,0, 0,017 m). Schwarze Säulen: Glutaminsäure in  $\mu$  Mol pro Ansatz +  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,0067 m); weiße Säulen: Glutamin (ohne Zusatz) in  $\mu$  Mol pro Ansatz. Säulen (nach oben) (Citrullinbildung in  $\gamma$  pro Ansatz): Substrat wurde zu Beginn des Versuches in toto zugegeben; Säulen (nach unten): Substrat wurde im Verlauf des Versuches in Anteilen von 20  $\mu$  Mol zugegeben, gleich am Anfang, dann nach 20 resp. 40 Minuten.

denen Glutamins zeigt, daß die verschwundene Menge von derselben Größenordnung ist wie die entstandene Menge Citrullin.

In anderen Versuchen haben wir Glutamin und Glutaminsäure statt auf einmal zu Beginn des Versuches allmählich in kleinen Anteilen zugesetzt. Diese Versuche (Fig. 3) bestätigen, daß eine bestimmte minimale Konzentration des Glutamins vorhanden sein muß, damit es wirksam wird. Es scheint, daß ein gewisser Schwellwert für das Glutamin notwendig ist, um es zum Reagieren zu bringen.

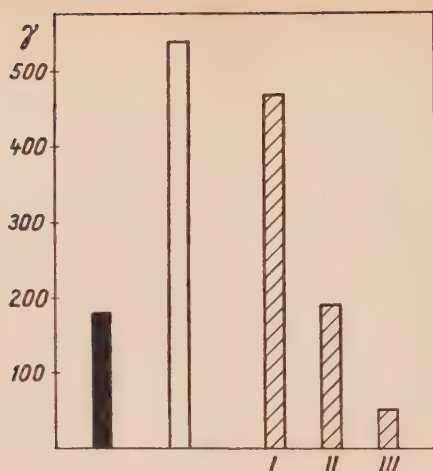


Fig. 4. Vergleich: Mitochondrien — ausgewaschenes Präparat.

Gesamtvolumen, Gasatmosphäre, Versuchsdauer, Temperatur, Ornithin,  $\text{NaHCO}_3$ , Adenosintriphosphat,  $\text{MgSO}_4$  wie im Versuch Fig. 1. Phosphatpuffer ( $\text{pH}$  7,0, 0,017 m). Glutaminsäure (0,017 m),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,0067 m). Schwarze Säule: Homogenat in isotonischer KCl-Lösung (= 2,64 mg N); weiße Säule: Mitochondriensuspension in isotonischem Mannit (= 1,7 mg N); schraffierte Säulen: I, II, III: der Rückstand wurde 1-, 2-, 3mal mit Mannit gewaschen (vgl. S. 27). Citrullinbildung in  $\gamma$  pro mg N.

#### b) Vergleich zwischen Mitochondrien und ausgewaschenem Präparat

Diese Überlegenheit des Glutamins im ausgewaschenen Präparat hat uns veranlaßt, in der Isolierung der Fermente noch weiter zu gehen. Ein Vergleich der Aktivitäten, bezogen auf mg N eines nach der Methode von *Cohen* und *Hayano* zubereiteten Präparats und einer Mitochondriensuspension, zeigt die deutliche Überlegenheit der Mitochondrien (Fig. 4). Wie bereits erwähnt, ist aber der N-Gehalt keine sichere Vergleichsbasis, da noch andere nicht zu den Mitochondrien gehörenden N-Verbindungen im Präparat nach *Cohen* und *Hayano* enthalten sind.

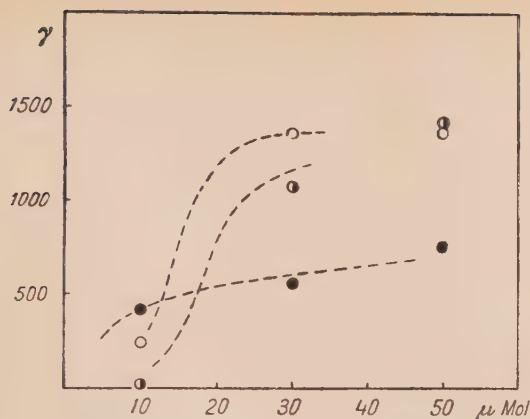


Fig. 5. Citrullinsynthese bei Gegenwart von Glutaminsäure oder Glutamin (Mitochondrien).

Mitochondriensuspension (= 0,85 mg N) in 3 ccm Gesamtvolumen, Gasatmosphäre, Versuchsdauer, Temperatur, Ornithin, NaHCO<sub>3</sub>, Adenosintriphosphat, MgSO<sub>4</sub> wie im Versuch Fig. 1. Phosphatpuffer (pH 7,0, 0,0017 m). Abszisse: Konzentration der Glutaminsäure oder des Glutamins in μ Mol pro Ansatz. Ordinate: Citrullinbildung in γ. ● bei Gegenwart von Glutaminsäure + NH<sub>4</sub>Cl (0,0067 m bzw. 0,0033 m bei der kleinsten Glutaminsäurekonzentration). ○ Glutamin (ohne Zusatz). ○ Glutamin + NH<sub>4</sub>Cl (Konzentration wie bei der Glutaminsäure).

Die völlige Inaktivität des Rückstandes (Fig. 5) nach dreimaligem Auswaschen mit Mannit beweist, daß die Gesamtheit der Fermente im Überstehenden lokalisiert ist, das sich histologisch als mehr oder weniger reine Mitochondriensuspension erwies. Wir sind darum berechtigt, die Mitochondrien mit der Citrullinsynthese in Zusammenhang zu bringen.

Gegenüber fallenden Konzentrationen von Glutamin und Ammoniumglutamat verhält sich unsere Mitochondriensuspension gleich wie ein ausgewaschenes Präparat (Fig. 5). Überhaupt sind die Resultate mit Mitochondrien und ausgewaschenem Präparat übereinstimmend, abgesehen von der gesteigerten Aktivität.

c) *Abhängigkeit von Adenosintriphosphat*

Wir konnten die Befunde von *Cohen* und *Hayano* bestätigen, wonach die Citrullinsynthese von der Konzentration des zugesetzten A.T.P. abhängig ist. Bis zu etwa  $1 \mu$  Mol A.T.P. pro 3 ccm nimmt die Umsatzgeschwindigkeit proportional der A.T.P.-Konzentration zu. Von etwa  $2 \mu$  Mol/3 ccm an nimmt sie nur noch wenig zu.

d) *Einfluß von Dicarbonsäuren und Ketosäuren*

$\alpha$ -Ketoglutarsäure in Gegenwart von Ammoniumsalz kann die Glutaminsäure teilweise ersetzen: das ausgewaschene Homogenat enthält offenbar die Glutaminsäuredehydrase, welche die reduktive Aminierung der Ketoglutarsäure ermöglicht.

Zusatz von Fumarat ist für die Synthese nicht nötig. Die Glutaminsäure liefert jedenfalls nach ihrer Desaminierung genügend Dicarbonsäure, um die oxydative Phosphorylierung aufrecht zu erhalten. *Borsook* und *Dubnoff* [5] setzen dem nativen Homogenat Fumarat oder Oxalacetat zu, um bei Gegenwart von Ornithin maximale Werte der Arginin(Harnstoff)-Synthese zu erhalten. Es ist möglich, daß im kompletten Homogenat die Verhältnisse etwas anders liegen als in unseren, im wesentlichen aus der Mitochondrienfraktion bestehenden Fermentpräparaten.

Bei Gegenwart von Oxalacetat haben wir eine Hemmung der Synthese beobachtet, die beim Glutamin stärker ist als bei der Glutaminsäure ( $6,6 \mu$  Mol Glutamin,  $6,6$ — $13,3 \mu$  Mol Oxalacetat pro ccm). Fumarat (in Mengen von  $13,3 \mu$  Mol/ccm) ist bei kleinen Substratkonzentrationen ( $6,6 \mu$  Mol/ccm) indifferent; bei höheren Konzentrationen von Glutamin oder Glutaminsäure ( $17 \mu$  Mol/ccm) dagegen hemmt es deutlich. Pyruvat ( $13,3 \mu$  Mol/ccm) fördert bei kleinen Substratkonzentrationen. *cis*-Aconitat hemmt die Citrullinbildung bei Gegenwart von Glutaminsäure stärker als bei Gegenwart von Glutamin. Wir verzichten darauf, diese Versuche einzeln anzuführen. Die Resultate sind nicht ganz regelmäßig und können noch nicht interpretiert werden. Sie zeigen, daß offenbar ein sehr komplexes System vorliegt.

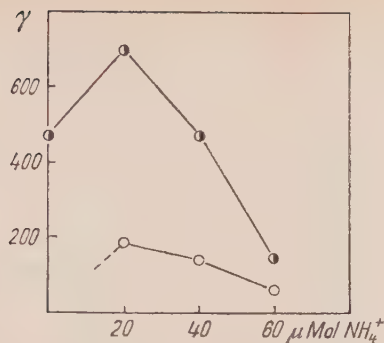


Fig. 6. Abhängigkeit der Citrullinsynthese von der  $\text{NH}_3$ -Konzentration. Mitochondriensuspension 0,5 ccm in 3 ccm. Gesamtvolumen, Gasatmosphäre, Versuchsdauer, Temperatur, Ornithin,  $\text{NaHCO}_3$ , Adenosintriphosphat,  $\text{MgSO}_4$  wie im Versuch Fig. 1. Phosphatpuffer ( $\text{pH}$  7,0, 0,017 m). Glutaminsäure, Glutamin (0,013 m). Abszisse:  $\mu\text{Mol NH}_4\text{Cl}$  in 3 ccm. Ordinate: Citrullinbildung in  $\gamma$ . ○ in Gegenwart von Glutaminsäure. ● in Gegenwart von Glutamin.

#### e) Einfluß der $\text{NH}_3$ -Konzentration

Ohne  $\text{NH}_4^+$ -Ionen gibt die Glutaminsäure keine nennenswerten Mengen Citrullin (Cohen und Hayano). Mit Glutamin dagegen erhält man von 10—13,3  $\mu\text{Mol/ccm}$  an ebenso viel wie mit der äquivalenten Menge Glutamin +  $\text{NH}_4^+$ . Wir haben bei den meisten Versuchen eine Ammoniumchloridkonzentration von 3,3  $\mu\text{Mol/ccm}$  verwendet. Bei höheren Konzentrationen als 13  $\mu\text{Mol/ccm}$   $\text{NH}_4^+$  sinken, wie Fig. 6 zeigt, die Umsätze ab. Ammoniak wirkt also bei höheren Konzentrationen hemmend. Eine ähnliche Hemmung durch Ammoniak findet man bei der Harnstoffbildung in Leberschnitten. Möglicherweise verdrängt das Ammoniak das basische Ornithin von einem Fermentprotein (vgl. Leuthardt [24]).

#### f) Hemmung durch Malonat

Die Citrullinsynthese wird, wie Fig. 7 zeigt, durch Malonat gehemmt, und zwar ist die Verminderung der Umsatzgröße für Glutaminsäure etwas stärker als für Glutamin. Nach früheren

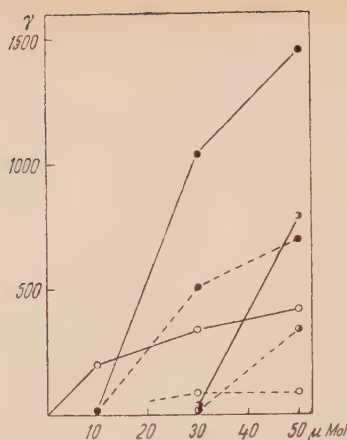


Fig. 7. Hemmung der Citrullinsynthese durch Malonat.

0,5 ccm Homogenat in 3 ccm Gesamtvolumen, Gasatmosphäre, Versuchsdauer, Temperatur, Ornithin,  $\text{NaHCO}_3$ , Adenosintriphosphat,  $\text{MgSO}_4$  wie im Versuch Fig. 1. Phosphatpuffer. ( $\text{pH}$  7,0, 0,017 m). Malonat (0,0025 m). Abszisse: Konzentration der Glutaminsäure oder des Glutamins in  $\mu$  Mol pro 3 ccm. Ordinate: Citrullinbildung in  $\gamma$ . ○ bei Gegenwart von Glutaminsäure +  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,0033 m). ● bei Gegenwart von Glutamin allein. ● bei Gegenwart von Glutamin +  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,0033 m). Ausgezogene Kurven: Werte ohne Malonatzusatz; gestrichelte Kurven: Werte mit Malonatzusatz.

Erfahrungen dürfte die Malonathemmung dadurch zustande kommen, daß die Succinatoxydation und damit die oxydative Resynthese des Adenosintriphosphats verhindert ist (vgl. *Fahrländer* u. Mitarb. [68]). Die Malonathemmung wird durch Fumarat aufgehoben oder wenigstens vermindert.

### g) $\alpha$ -Ureidoglutarsäure und Citrullinsynthese

Wir haben einleitend auf die Möglichkeit hingewiesen, daß bei der Bildung des Citrullins aus dem Ornithin zunächst an einen Träger eine Carbamylgruppe ( $-\text{CONH}_2$ ) aufgebaut und nachträglich auf die  $\delta$ -Aminogruppe des Ornithins übertragen wird in Analogie zur Amidinübertragung bei der Kreatinsynthese. Wir haben von diesem Gedankengang ausgehend als Modells substanz

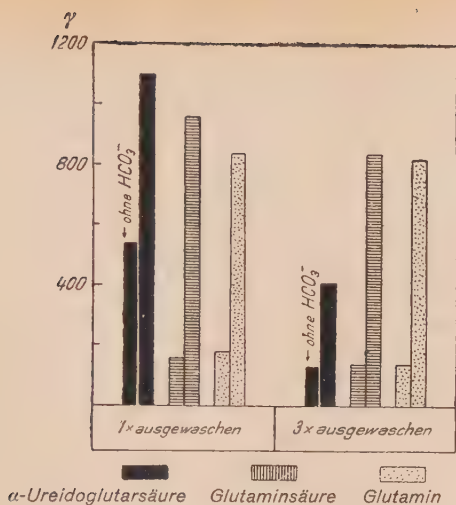


Fig. 8. Citrullinsynthese aus  $\alpha$ -Ureidoglutarate.

0,5 ccm Homogenat in 3 ccm. Gesamtvolumen, Phosphatpuffer ( $p_H$  7,0, 0,017 m), Ornithin,  $NaHCO_3$ , Adenosintriphosphat,  $MgSO_4$  wie im Versuch Fig. 1. Fumarat (0,0166 m). Versuchsdauer 25 Minuten bei 38°. Citrullinbildung in  $\gamma$ . Die linke Säule eines jeden Paares gibt den Wert ohne  $NaHCO_3$  (in der Luft geschüttelt), die rechte bei Gegenwart von  $NaHCO_3$ . Gruppe links: Homogenat einmal ausgewaschen; Gruppe rechts: Homogenat dreimal ausgewaschen.

die  $\alpha$ -Ureidoglutarate (N-Carbamylglutaminsäure) untersucht und dabei gefunden, daß bei Gegenwart von  $NH_4^+$ -Ionen und Fumarat Ureidoglutarate Citrullin liefert. (Die Farbentwicklung mit Diacetylmonoxim ist bei der  $\alpha$ -Ureidoglutarate im Vergleich zum Citrullin so gering, daß bei der Bestimmung kein Fehler entsteht.) Ohne Fumarat ist die Substanz unwirksam. Unterdessen haben Cohen und Grisolia [57] über Versuche mit der gleichen Substanz berichtet. Sie fanden, daß Ureidoglutarate in Gegenwart von  $NH_4^+$ -Ionen, aber in Abwesenheit von Hydrogencarbonat, 10—15-mal mehr Citrullin bildet als die gleiche Menge Glutaminsäure. Bei Gegenwart von Hydrogencarbonat ist sie 2—3-mal aktiver als die Glutaminsäure. Wir haben diese Resultate bestätigt, fanden aber im Hydrogencarbonatmilieu die Ureidosäure nicht aktiver als die Glutaminsäure. In Abwesenheit von Hydro-

gencarbonat betrug der maximale Unterschied etwa das Vierfache. Die Aktivität des Fermentpräparats gegenüber Ureidoglutarsäure nimmt beim Auswaschen stark ab, währenddem die Aktivität gegenüber Glutaminsäure kaum verändert wird. Im Versuch, der in Fig. 8 dargestellt wird, gibt das dreimal ausgewaschene Homogenat im Hydrogencarbonat-freien Milieu mit Ureidoglutarsäure nicht mehr Citrullin als mit Glutaminsäure; bei Gegenwart von  $\text{NaHCO}_3$  gibt die Ureidosäure sogar weniger als die Glutaminsäure.

Ein besonders interessantes Resultat von *Cohen* und *Grisolia* [57] ist das folgende: „In the presence of ammonia, incubation of carbamyl-1-glutamic acid with the enzyme system aerobically followed by the addition of ornithine on anaerobic incubation results in citrulline synthesis. All efforts to date to make the overall reaction ornithine  $\rightarrow$  citrulline proceed anaerobically have been unsuccessful“. Es scheint also, daß während der ersten Phase in Abwesenheit von Ornithin ein Zwischenprodukt gebildet wird, das in der folgenden anaeroben Phase mit Ornithin reagiert und Citrullin liefert.

In der Weiterverfolgung dieser Versuche, wobei Mitochondrien verwendet wurden, haben wir die folgenden Feststellungen gemacht: Man erhält bedeutend mehr Citrullin, wenn man während der ersten Phase außer Ureidoglutarsäure und Ammoniumsalz noch Glutaminsäure zusetzt (Fig. 9). Ammoniumglutamat läßt sich durch Glutamin ersetzen. Bei Gegenwart von Glutaminsäure kann man die Konzentration der Ureidoglutarsäure bedeutend herabsetzen, ohne die Citrullinausbeute entsprechend zu verringern (Fig. 9). Ureidoglutarsäure allein ist unwirksam, wenn dem Milieu nicht Fumarat zugesetzt wird. Dagegen ist bei Gegenwart von Glutaminsäure Fumarat überflüssig; es hat dann im Gegenteil eher eine hemmende Wirkung auf die Citrullinsynthese.

#### h) Hemmung durch Janusgrün

Die Verfolgung der Citrullinsynthese in den Mitochondrienpräparaten ergab, wie schon erwähnt, genau die gleichen Resultate wie die Versuche mit den ausgewaschenen Präparaten. Im

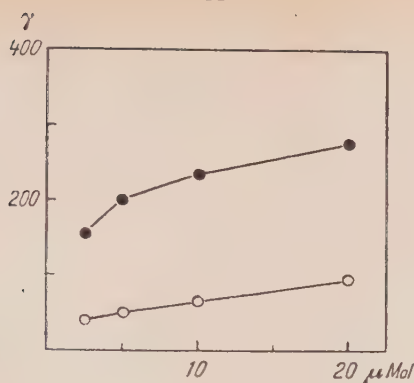


Fig. 9. Citrullinsynthese im zweiphasischen Versuch.

0,5 ccm Mitochondriensuspension in 3,3 ccm. Gesamtvolumen, Ornithin,  $\text{NaHCO}_3$ , Adenosintriphosphat,  $\text{MgSO}_4$  wie im Versuch Fig. 1. Glutaminsäure (0,013 m).  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,0033 m). Die Ansätze wurden in Warburg-Gefäßchen zuerst 30 Minuten unter aeroben Bedingungen geschüttelt, aber ohne Ornithinzusatz, dann der Sauerstoff durch Stickstoff verdrängt, das Ornithin aus dem Anhang eingekippt und weitere 30 Minuten geschüttelt. Abszisse: Konzentration der  $\alpha$ -Ureidoglutar-säure in  $\mu$  Mol pro Ansatz. Ordinate: Citrullinbildung in  $\gamma$ . ○ bei Gegenwart von  $\alpha$ -Ureidoglutar-säure,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und Fumarat (0,0166 m). ● bei Gegenwart von  $\alpha$ -Ureidoglutar-säure, Glutaminsäure und  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Hinblick aber auf die elektive Färbbarkeit der Mitochondrien durch Janusgrün haben wir untersucht, ob die Citrullinsynthese durch diesen Farbstoff gehemmt wird. Das ist in der Tat schon bei Konzentrationen der Größenordnung  $10^{-5}$ — $10^{-6}$  m der Fall. Die Mitochondriensuspension bindet den Farbstoff außerordentlich fest. Nach Fällung des Ansatzes mit Trichloressigsäure erhält man bei kleinen Farbstoffkonzentrationen (z. B. bis  $1,6 \times 10^{-5}$  m) völlig farblose überstehende Lösungen. Es hat sich nun gezeigt, daß die Hemmung durch den Farbstoff praktisch vollständig ist, wenn man soviel Janusgrün zusetzt, daß man nach der Fällung der Suspension durch Trichloressigsäure gerade eine schwach gefärbte überstehende Lösung erhält. Man kann annehmen, daß in diesem Fall die Mitochondrien mit dem Farbstoff „gesättigt“ sind. Mit abnehmender Konzentration des Farbstoffs nimmt auch die Hemmung ab. Man erhält, wenn man die Aktivität des Systems gegen den Logarithmus der Farbstoffkonzentration aufträgt,

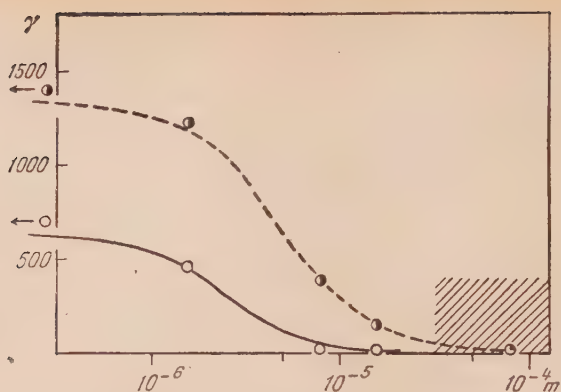


Fig. 10. Hemmung der Citrullinsynthese durch Janusgrün.

Versuchsbedingungen wie im Versuch Fig. 5. Glutaminsäure, Glutamin  $50 \mu\text{ Mol}$  pro Ansatz. Abszisse: Konzentration des Farbstoffes in  $\mu\text{ Mol}$  pro ccm. Ordinate: Citrullinbildung in  $\gamma$ .  $\circ$  Glutaminsäure +  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $0,0067 \text{ m}$ ).  $\bullet$  Glutamin (ohne Zusatz). Die Punkte links außen geben die Citrullinbildung ohne Farbstoffzusatz; die schraffierte Fläche bezeichnet den Konzentrationsbereich des Farbstoffes, in welchem die überstehende Lösung nach Fällung der Suspension mit Trichloressigsäure gefärbt erscheint, in welchem also die Mitochondrien nicht mehr allen Farbstoff zu binden vermögen.

die Kurven in Fig. 10, die den typischen S-förmigen Verlauf von Dissoziationskurven erkennen lassen. Wenn man die Aktivität des Fermentes als Maß für den „Sättigungsgrad“ der Mitochondrien mit dem Farbstoff nimmt, kann man aus diesen Kurven ablesen, daß die Mitochondrien bei einer Konzentration des Janusgrüns von ca.  $5 \times 10^{-6}$  zur Hälfte „gesättigt“ sind. Wir betrachten das Parallelgehen von Fermenthemmung und elektiver Farbstoffbindung durch die Mitochondrien als weitere Stütze für unsere Annahme, daß die Synthese in den Mitochondrien stattfindet. Die Kurven zeigen, daß die Synthese im Glutaminsäurehaltigen System stärker gehemmt wird als im Glutaminhaltigen. Auch in dieser Tatsache spiegelt sich eine gewisse Überlegenheit des Glutamins als Citrullinbildner. Über die Wirkungsart des Janusgrüns können wir nichts aussagen.

#### 4. Diskussion

Aus den beschriebenen Versuchen ergibt sich in erster Linie die Frage, welche Rolle das Glutamin bei der Citrullinsynthese spielt. Im Bereich der hohen Substratkonzentration (vgl. Fig. 1, 5) ergibt Glutamin mit und ohne Zusatz von Ammoniumsalzen höhere Ausbeuten an Citrullin als Glutaminsäure. Diese Überlegenheit des Amids über die Säure kann nicht durch Hydrolyse erklärt werden, sonst würde Glutamin höchstens soviel Citrullin liefern als die Glutaminsäure. Es wäre zwar denkbar, daß ein Überschuß von Ammoniumionen den Vorgang hemmt und daß das Glutamin deshalb wirksamer erscheint, weil die Säureamidgruppe das Ammoniak nur allmählich abgibt. Diese Annahme trifft aber nicht zu, denn die Wirksamkeit des Glutamins bleibt je nach seiner Konzentration bei Zusatz von Ammoniumionen entweder unverändert oder wird stark gesteigert (vgl. Fig. 1, 5). Unsere Beobachtungen müssen also dahin interpretiert werden, daß die Säureamidgruppe des Glutamins bei der Synthese eine spezifische Funktion hat.

Andererseits lassen es die bisherigen Versuche als wenig wahrscheinlich erscheinen, daß das Glutamin eine direkte Zwischenstufe der Synthese darstellt. Gegen eine solche Annahme spricht seine Unwirksamkeit in kleinen Konzentrationen. Unterhalb einer Konzentration von etwa  $3 \mu \text{ Mol/ccm}$  liefert das System Glutaminsäure — Ammoniumionen unter allen Bedingungen mehr Citrullin als das Glutamin, und diese Konzentration ist immer noch beträchtlich höher als die in den Geweben durch direkte Messung festgestellte Menge (vgl. *Hamilton* [21], *Ferdman* u. Mitarb. [69]). Die Überlegenheit des Glutamins gegenüber der Glutaminsäure bei höheren Konzentrationen läßt aber den Schluß zu, daß das Amid zu einem Zwischenprodukt der Synthese in enger Beziehung steht.

Ebenso schwierig ist die Rolle der  $\alpha$ -Ureidoglutarsäure zu beurteilen. Die Substanz ist bisher nicht als natürliches Produkt des Stoffwechsels nachgewiesen worden. Es ist möglich, daß die Carbamylgruppe ( $-\text{CONH}_2$ ) der Ureidosäure auf irgend eine Weise auf die  $\delta$ -Aminogruppe des Ornithins übertragen werden

kann, ähnlich wie bei der Kreatinsynthese die Amidgruppe des Arginins auf die Aminogruppe des Glykokolls übertragen wird. Mit dieser Annahme ist die Tatsache vereinbar (*Cohen* und *Grisolia* [57]), daß Ureidoglutarsäure auch ohne Hydrogencarbonat Citrullin bildet. Dagegen ist nicht verständlich, warum ohne Ammoniumionen kein Citrullin entsteht. Man müßte annehmen, daß das Ammoniumsalz indirekt wirkt, indem es an einem Gleichgewicht teilnimmt und auf diese Weise den Zerfall eines Zwischenproduktes verhindert.

Wie im experimentellen Teil mitgeteilt wurde, erhält man bedeutend erhöhte Ausbeuten an Citrullin, wenn im zweiphasischen Versuch das Milieu neben Ureidoglutarsäure und Ammoniumionen noch Glutaminsäure enthält. Die Ammoniumionen sind auch bei Gegenwart von Glutaminsäure unentbehrlich, doch kann das Ammoniumglutamat durch Glutamin ersetzt werden. Es ist aber in diesem Fall nicht möglich zu entscheiden, ob das Amid in spezifischer Weise reagiert oder einfach durch Hydrolyse Ammoniumionen und Glutaminsäure liefert. Versuche über den Abbau der Ureidoglutarsäure in Leberhomogenaten haben gezeigt, daß die Ureidoglutarsäure zum Teil in Glutaminsäure übergeht. Erst eine genauere Analyse der Reaktion wird darüber Aufschluß bringen, ob unter allen Umständen während der ersten (aeroben) Phase der Reaktion neben der Ureidosäure auch Glutaminsäure vorhanden sein muß.

Die Notwendigkeit, der Ureidoglutarsäure noch Fumarat zuzusetzen (vgl. S. 39), erklärt sich wahrscheinlich durch die mangelnde oxydative Resynthese des Adenosintriphosphats, wenn außer der Ureidosäure kein anderes Substrat zugegen ist. Wie in früheren Untersuchungen gezeigt wurde, liefert die Glutaminsäure genügend Fumarat, um die Phosphorylierung aufrecht zu erhalten [68], so daß sich in diesem Fall der Fumaratzusatz erübrigt.

Die Fixierung der Kohlensäure bei der Synthese des Citrullins aus dem Ornithin ist somit ein noch nicht gelöstes Problem. Die Versuche von *Cohen* u. Mitarb. zeigen aber, daß die Glutaminsäure daran beteiligt ist. Wie schon erwähnt, ist die primäre Bildung einer *Siegfried'schen* Carbaminsäure mit der  $\delta$ -Aminogruppe des Ornithins nicht möglich, weil sich die Carbamino-

säuren nur aus einer nicht ionisierten Aminogruppe und Kohlendioxyd bilden können, die  $\delta$ -Aminogruppe des Ornithins dazu aber zu basisch ist [70]. Um dieser Schwierigkeit auszuweichen, haben wir früher die Ansicht entwickelt, daß das  $\text{CO}_2$  zuerst als Carboxyl in  $\beta$ -Stellung zu einer Carbonylgruppe fixiert und darauf in ein Säureamid übergeführt wird; darauf sollte eine Übertragung der gebildeten  $-\text{CONH}_2$ -Gruppe auf das Ornithin erfolgen [23]. Versuchsdaten, die seither bekannt geworden sind, zeigen, daß eine derartige Annahme aber wenig wahrscheinlich ist. *Mackenzie* und *Du Vigneaud* [71] haben nach Verfütterung von Methionin, das in der labilen Methylgruppe mit radioaktivem Kohlenstoff markiert war, den Isotopengehalt der Atmungskohlensäure und des Harnstoffs verglichen und identische Werte gefunden. Würde, wie oben angenommen, das C-Atom des Harnstoffs aus einer Carboxylgruppe stammen, die auch durch direkte Oxydation einer Kohlenstoffkette entstehen kann ( $\beta$ -Carboxyl der Oxalessigsäure oder der Oxalbernsteinsäure), so müßte der Harnstoff weniger  $\text{C}^{14}$  enthalten als die Atmungskohlensäure. Die Befunde der genannten Autoren sprechen dafür, daß die Kohlensäure die einzige Quelle des C-Atoms im Harnstoff ist. In einer vor kurzem erschienenen Arbeit haben auch *Grisolia* und *Cohen* [72] den Nachweis geleistet, daß das Citrullin, welches im Leberhomogenat gebildet wird, gleichviel  $\text{C}^{14}$  enthält wie das zugesetzte Hydrogencarbonat.

Die zuerst von *Leuthardt* und *Glasson* entwickelte Ansicht, daß bei der Citrullinsynthese die Kohlensäure und das Ammoniak nicht direkt auf dem Ornithinmolekül, sondern zuerst auf einem Träger fixiert werden, der erst sekundär mit dem Ornithin reagiert, hat hingegen durch alle neueren Untersuchungen an Wahrscheinlichkeit gewonnen. Aber der ursprünglich angenommene Mechanismus der Reaktion entspricht jedenfalls nicht der Wirklichkeit. Die hohe Wirksamkeit des Pyruvats, die zu jener Annahme geführt hatte, erklärt sich durch dessen Verwandlung in Glutaminsäure [73]. Die letztere erscheint bei Schnittversuchen unwirksam, weil sie viel schlechter in das intakte Gewebe eindringt als das Pyruvat.

Die Tatsache, daß die Citrullinsynthese an die Mitochondrien

gebunden ist, scheint nach unseren Versuchen bewiesen zu sein. Man müßte dann schon annehmen, daß unsere Fermentsuspension, die sich histologisch im Phasenmikroskop als sozusagen reine Mitochondrienaufschwemmung erwiesen hat, noch viele submikroskopische Teilchen enthält, die entscheidend mitwirken würden an der biologischen Citrullinsynthese, was aber wenig wahrscheinlich erscheint.

## Zusammenfassung

1. Wir haben gezeigt, daß die zur biologischen Citrullinsynthese aus Ornithin nötigen Fermente in den Mitochondrien der Leber lokalisiert sind.

2. Wir haben die Synthese des Citrullins aus Ornithin durch die Mitochondrienfraktion und das ausgewaschene Leberhomogenat (Ratte) bei Gegenwart von Glutamin untersucht. Bei Glutaminkonzentrationen von 20–30  $\mu$  Mol/ccm ist das Amid mit oder ohne Zusatz von Ammoniumsalzen der Glutaminsäure + Ammoniumsalz stark überlegen. Bei kleinen Konzentrationen unter 3  $\mu$  Mol/ccm liefert aber die Glutaminsäure unter allen Umständen mehr Citrullin als das Glutamin. Es ist also wenig wahrscheinlich, daß das Glutamin eine direkte Zwischenstufe der Synthese ist. Die Wirksamkeit des Amids läßt sich andererseits aber nicht einfach durch die Hydrolyse der Säureamidgruppe erklären. Dieselbe scheint eine spezifische Funktion zu haben. Das Glutamin steht offenbar zu einem Zwischenglied der Citrullinsynthese in enger Beziehung.

3. Die  $\alpha$ -Ureidoglutarsäure liefert bei Gegenwart von Fumarat und von Ammoniumsalzen ebenfalls Citrullin. Wir haben das Verhalten der  $\alpha$ -Ureidoglutarsäure unter verschiedenen Bedingungen untersucht und können die Ergebnisse von *Cohen* und *Grisolia*, die zu unserer Kenntnis gelangt sind, während diese Untersuchung im Gang war, im wesentlichen bestätigen.

---

Am Schluß dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. *F. Leuthardt* für die Anregung zu diesem Thema meinen herzlichsten Dank aussprechen. Er war stets bereit, mir mit wertvoller und freundlicher Unterstützung beizustehen. Mein Dank gebührt auch allen Helfern bei den Versuchen, die für mich eifrig interessierte Mitarbeiter waren.

## Literatur

1. A. Kossel und H. D. Dakin: Z. physiol. Ch. **41**, 321 (1904).
2. H. A. Krebs und K. Henseleit: Z. physiol. Ch. **210**, 33 (1932).
3. V. R. Potter und A. Elvehjem: J. Biol. Chem. **114**, 195 (1936).
4. P. P. Cohen und M. Hayano: J. Biol. Chem. **170**, 687 (1947).
5. H. Borsook und J. W. Dubnoff: J. Biol. Chem. **169**, 461 (1947).
6. A. G. Gornall und A. Hunter: J. Biol. Chem. **147**, 593 (1943).
7. R. Schoenheimer, S. Ratner und D. Rittenberg: J. Biol. Chem. **127**, 333 (1939).
8. S. J. Bach: Biochem. J. **33**, 1833 (1939).
9. J. H. Nadine und J. M. Buchanan: Am. J. med. Sciences **213**, 248 (1947).
10. S. Grisolia und P. P. Cohen: J. Biol. Chem. **176**, 929 (1948).
11. F. Leuthardt: Z. physiol. Ch. **252**, 238 (1938).
12. W. Löffler: Bioch. Z. **85**, 230 (1918).
13. P. P. Cohen und M. Hayano: J. Biol. Chem. **170**, 687 (1947).
14. H. Borsook und J. W. Dubnoff: J. Biol. Chem. **141**, 717 (1941).
15. P. P. Cohen und M. Hayano: J. Biol. Chem. **166**, 251 (1946).
16. A. E. Braunstein und M. G. Kritzman: Enzymologia **2**, 129 (1937).
17. R. Schoenheimer: The dynamic State of Body Constituents. Harvard University Press, Cambridge, Mass., 1942.
18. A. Oerström, M. Oerström und H. A. Krebs: Biochem. J. **33**, 990 (1939).
19. F. Leuthardt: Z. physiol. Ch. **270**, 113 (1941).
20. D. D. van Slyke, R. A. Philips, P. B. Hamilton, R. M. Archibald, P. H. Fitcher und A. Miller: J. Biol. Chem. **150**, 481 (1943).
21. P. B. Hamilton: J. Biol. Chem. **158**, 397 (1945).
22. H. A. Krebs: Ann. Rev. Biochem. **5**, 247 (1936).
23. F. Leuthardt und B. Glasson: Helv. Physiol. Acta **2**, 549 (1944); Helv. Chim. Acta **25**, 630 (1942).
24. F. Leuthardt: La synthèse biologique de l'urée. Exposés annuels de Biochimie médicale, publ. par M. Polonovski, Vol. **8**, 7 (1948).
25. H. G. Wood und C. H. Werkman: Biochem. J. **32**, 1262 (1938); **34**, 7 (1940).
26. F. Leuthardt und B. Glasson: Helv. Physiol. Acta **4**, C 18 (1946).
27. L. Monné: Advances in Enzymology **8**, 1 (1948); Exper. **2**, 153 (1946).
28. R. Altmann: Studien über die Zelle. Leipzig 1886.
29. Zit. nach G. Hertwig in v. Möllendorff: Hdb. mikr. Anat. **I**, 1 (1929).

30. *Meves*: Arch. mikr. Anat. II **92**, 41 (1918).
31. *R. R. Bensley*: Anat. Rec. **69**, 341 (1937).
32. *L. Michaelis*: Arch. mikr. Anat. **55**, 558 (1900).
33. *M. A. Guillermond*: Rev. gén. de Botanique **31**, 372 (1919).
34. *R. Altmann*: Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu der Zelle. Leipzig 1890.
35. *B. Romeis*: Mikroskopische Technik, 15. Aufl., Leibniz Verlag, München 1948.
36. *M. Lewis und W. Lewis*: Am. J. Anat. **17**, 339 (1914/15).
37. *J. Bang und E. Sjövall*: Beitr. z. path. Anat. u. z. allg. Path. **62**, I (1916).
38. *H. U. Zollinger*: Mikroskopie **3**, 1 (1948); Am. J. Path. **24**, 545, 569 (1948).
39. *S. Meltzer*: Amer. Medicine **8**, 191 (1904).
40. *A. Claude und E. F. Fulman*: J. Exp. Med. **81**, 51 (1945).
41. *A. Meyer*: Morph. physiol. Analyse der Zelle, der Pflanze und Tiere, I. Teil. Verlag Fischer, Jena 1920.
42. *A. Claude*: Biol. Symposia, Lancaster, **10**, 111 (1943).
43. *W. C. Schneider*: J. Biol. Chem. **161**, 293 (1945).
44. *E. Cowdry*: General Cytology. University Chicago Press, Chicago 1924.
45. *A. Claude*: Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biology **9**, 263 (1941); J. Exp. Med. **80**, 19 (1944).
46. *R. R. Bensley und N. L. Hoerr*: Anat. Rec. **60**, 449 (1934).
47. *V. R. Potter*: J. Biol. Chem. **163**, 437 (1946).
48. *G. H. Hogeboom, A. Claude und R. D. Hotchkiss*: J. Biol. Chem. **165**, 615 (1946).
49. *W. C. Schneider*: J. Biol. Chem. **165**, 585 (1946). — *W. C. Schneider, A. Claude und G. H. Hogeboom*: J. Biol. Chem. **172**, 451 (1948).
50. *G. H. Hogeboom, W. C. Schneider und G. E. Pallade*: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **65**, 320 (1947).
51. *K. Holter, H. Lanz jr. und K. Linderstrom-Lang*: J. cell. comp. Physiol. **10**, 423 (1937).
52. Zit. nach *J. Brachet*: Embryologie chimique. Masson, Paris 1941.
53. *A. L. Lehninger und E. P. Kennedy*: Fed. Proc. **7**, 166 (1948); J. Biol. Chem. **172**, 847 (1948).
54. *W. C. Schneider*: J. Biol. Chem. **176**, 259 (1948).
55. *D. E. Green, W. F. Loomis und V. H. Auerbach*: J. Biol. Chem. **172**, 389 (1948).
56. *P. P. Cohen und M. Hayano*: J. Biol. Chem. **172**, 405 (1948).
57. *P. P. Cohen und S. Grisolia*: J. Biol. Chem. **174**, 389 (1948).
58. *L. O. Krampitz und C. H. Werkman*: Biochem. J. **35**, 595 (1941).
59. *W. Wislicenus und M. Waldmüller*: B. **44**, 1564 (1911).
60. *H. B. Vickery, G. W. Pucher und H. E. Clark*: J. Biol. Chem. **109**, 39 (1935).
61. *D. Keilin und E. F. Hartree*: Proc. Roy. Soc., Ser. B **122**, 298 (1937).

62. *D. M. Needham*: Biochem. J. **36**, 113 (1942).
63. *G. A. Le Page* in *W. W. Umbreit; R. H. Burris und J. F. Stauffer*:  
Manometric techniques and related methods. Burgess Publ. Comp.,  
Minneapolis 1945.
64. *R. M. Archibald*: J. Biol. Chem. **156**, 121 (1944).
65. *W. R. Fearon*: Biochem. J. **33**, 903 (1933).
66. *F. Leuthardt und E. Bujard*: Helv. med. acta **14**, 274 (1947).
67. *A. E. Sobel, M. Mayer und S. P. Gottfried*: J. Biol. Chem. **156**, 355  
(1944).
68. *H. Fahrländer, P. Favarger und F. Leuthardt*: Helv. Chim. Acta **31**,  
942 (1948).
69. *D. L. Ferdman, S. R. Frenkel und L. I. Silakoya*: Biokhimia **7**, 43 (1942),  
zit. nach *M. Archibald*, Chem. Rev. **37**, 161 (1945).
70. *F. Leuthardt und R. Brunner*: Helv. Chim. Acta **30**, 958 (1947).
71. *C. G. Mackenzie und V. Du Vigneaud*: J. Biol. Chem. **172**, 353 (1948).
72. *S. Grisolia und P. P. Cohen*: J. Biol. Chem. **176**, 929 (1948).
73. *H. Fahrländer, H. Nielsen und F. Leuthardt*: Helv. Chim. Acta **31**, 957  
(1948).
74. *H. A. Krebs*: Biochem. J. **29**, 1951 (1935).

## **Curriculum vitae**

Am 29. August 1921 wurde ich in St. Gallen geboren. Ich besuchte die Primarschule in Flawil, das Kantonale Gymnasium in St. Gallen, an dem ich im Herbst 1940 das Reifezeugnis erlangte. Das Medizinstudium begann ich in Genf; dort bestand ich auch die beiden propädeutischen Examina. Meine klinischen Semester absolvierte ich an den Universitäten Genf, Lausanne und Zürich, wo ich im Herbst 1946 mit dem Staatsexamen abschloß. Nach einem Aufenthalt in England (British Postgraduate School) arbeite ich seit Herbst 1947 als Assistent am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Zürich.





